



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

DISEÑO DE VECTORES BASADOS EN GENOMAS DE CORONAVIRUS: ESTABILIDAD Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

TESIS DOCTORAL

Martina Bécares Palacios

MADRID, Octubre de 2015



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DISEÑO DE VECTORES BASADOS EN GENOMAS DE CORONAVIRUS: ESTABILIDAD Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Memoria presentada por la Licenciada en Biotecnología D^a. Martina Bécares Palacios, adscrita al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Sonia Zúñiga Lucas y Luis Enjuanes Sánchez.

Madrid, Octubre de 2015



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Sonia Zúñiga Lucas y Luis Enjuanes Sánchez

Madrid, Octubre de 2015

Fdo. Sonia Zúñiga Lucas

Fdo. Luis Enjuanes Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Si la ciencia nos enseña a analizar objetivamente la realidad, un análisis objetivo muestra que este trabajo hubiese sido imposible sin la participación de muchas personas, que de una manera u otra me han acompañado durante estos años. Por ello a todos vosotros, muchas gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecer a los directores de este trabajo. Al profesor de investigación Luis Enjuanes, por haberme dado la oportunidad de formarme como científica en el enriquecedor ambiente de su laboratorio. Luis, muchas gracias por tu apoyo, por tu ejemplo constante de dedicación a la ciencia, y por ayudarme a crecer como científica y como persona- y, por qué no, por compartir planos televisivos. Gracias Sonia por tu eficiencia, por encontrar siempre el equilibrio perfecto entre ayudar y dejar libertad, y por tus consejos siempre útiles que van del plano científico al psicológico. Si alguna vez soy jefa, me gustaría ser como tú.

Gracias a todos mis compañeros del 114, muchos de ellos amigos, que han hecho que estos seis años estén llenos de momentos inolvidables. Empezando por los que ya se han ido, gracias Jazmina, Lorena y Sarhay por acogerme y enseñarme vuestros truquillos cuando llegué al laboratorio. Gracias a Pedro, Marta y al nada “irrelevante” Aitor por vuestra simpatía y ayuda siempre que la necesité. Y a mis chicos de la zona A, que desde el punto de vista formal se han ido, pero para mi siempre serán parte del laboratorio. Gracias Dr. Nieto, por ser el compañero perfecto y encontrar siempre las palabras adecuadas para hacerme sentir bien- aunque eso fuese modificar la ley del 70% al 60% hasta no saber cuál era la original. Gracias JMJ, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, comidas, cenas, cines, viajes y demás; admiro tu inteligencia, tu humor y tu humor inteligente, y espero volver a coincidir contigo en el futuro. Gracias JAR por los buenos momentos vividos durante estos años y por preocuparte siempre por mi como un buen amigo. Y a los que siguen en el *Coronalab*, Isabel, gracias por tu amabilidad, por tu pedagogía y por sacar siempre tiempo para ayudar, a pesar de tus innumerables ocupaciones; te deseo mucha suerte en tu nueva etapa como jefa del laboratorio. Carlos, gracias por los buenos consejos expertos, por tu a veces no tan buena música y porque, a pesar de tu bastante merecida fama de gruñón, me ha encantado descubrir tu lado artístico que no todos conocen. Marga, gracias por tu ayuda constante, y por hacernos la vida más fácil desde el primer hasta el último día. Lucía, o *Lucis* muchas gracias por tu mostrarme tu profesionalidad en el laboratorio y tu cara oculta al salir por la puerta, por no quejarte de mis continuas invasiones a tu sitio y por desarrollar la capacidad de comunicarte en infrasonidos para contar confidencias. Raúl, gracias por tu compartir tu buen hacer en el laboratorio siempre que has tenido la oportunidad, ojalá hubiese más personas con tu honestidad en el mundo de la ciencia. Charles, gracias por tus locuras científicas y artísticas, tus “expedientes Charles” y tu ejemplo sobre cómo no pelar una manzana. Y a las recientes incorporaciones al laboratorio, gracias por hacerme reír cada día y por todo el estrés liberado metiéndome con vosotros. Gracias Alex (Pascual) por compartir tus historias frikis, te has ganado una revancha para que puedas ganarme en alguna futura carrera, gracias Javi (Singer) por tu inocencia y por enseñarme a hacer dibujitos- aunque la alumna haya superado al maestro-, y gracias Javi (Paco) por tus sonrisas silenciosas, sé que llegarás lejos.

Gracias también a todas las personas de la primera planta, y del CNB en general que con su buen hacer profesional y personal hacen que el día a día sea más fácil, o más divertido. Silvi, compañera, amiga y gurú en aspectos deportivos y nutricionales, muchas gracias por entenderme- incluso con broncas- por tu ojo alineador y porque tu sentido de la amistad es sólo comparable a tu “malbichimso” que nos hace pasarlo tan bien; ojalá nos queden muchos “cotis” que compartir. Lidia, aunque nos hayamos empezado a conocer a fondo hace no hace mucho, que sepas que no “me das igual”, gracias por tus risas, por todo el tiempo que me has hecho ahorrar con tus consejos pre-tesis y por esos planes de sábado de los que, espero, queden muchos. Sara, gracias por tu alegría infinita y por encontrar siempre el lado bueno de cualquier cosa; me ha encantado compartir contigo momentos dentro y fuera del CNB. Joan, *joh, cuánto bueno!*, gracias por tu buen humor y tus enseñanzas teatrales. Fernando, gracias por tus críticas constructivas, por tu confianza y porque el difícil reto de intentar adelantarse a tus bromas es un buen aliciente cada día. Gracias Ibo por tus chistes, y por tu disponibilidad para debates científicos. Gracias a los chic@s de los laboratorios 116 y 118, por los buenos ratos en cultivos. Gracias Juan Carlos y Antonio, porque da gusto bajar al almacén aunque sólo sea para protestar un rato con vosotros, a David, Yolanda y Ana, gracias por vuestra amabilidad y a los chicos de seguridad, por recordarme durante seis años a qué hora es la ronda, aunque todavía tenga que esperar. Gracias Carol, Santa y Paloma por despertarnos cada mañana con una sonrisa. A Elena, gracias por estar también cerca en esta etapa en Madrid, y a todos los *Nokauts*, por todos los buenos momentos, los nervios previos y las ganas de comerse el mundo después.

Gracias a las personas que he conocido en Madrid, por hacer que no sea sólo la ciudad en la que vivo, sino mi otra casa. A mi “gemela” Ana, gracias por sus consejos sobre la vida y los “potis”, por encargarse siempre de organizar viajes y actividades y por ser una de las personas que mejor me comprende; espero que sigas mucho tiempo más con el entusiasmo que tienes ahora. Gracias a Vero, Ianire, Laura y Jiji por esos momentos de desconexión y numerosos cumpleaños. Gracias a los artistas de Action English- Tuesday group, por hacer que los martes sean siempre un buen día, y a los blanditos de A. Cross, gracias por la cañita que dais siempre, aunque vuestra actividad deportiva actual se reduzca a escribir whassaps. Y gracias a mis amigos de Zamora, MaryCarmen, Álvaro y Ana, por los buenos recuerdos y por seguir ahí después de 15 años, aunque cada vez vaya menos a veros.

Por último, a mi familia fuente de apoyo constante e incondicional a lo largo de toda mi vida. Papá, gracias por proporcionarme una buena educación y por la fuerza que me hace sentir saber que te sientes orgulloso. Mamá gracias por tu dedicación a nosotros durante toda la vida, por todo lo que has sacrificado por nosotros y por seguir haciendo que si un día no hablamos por teléfono sea un día “raro”. A Vicente, gracias por tu formalidad y por aguantarme durante estos años. A mi hermana pequeña, Upe, gracias por contestar siempre al grito de Piiiiiiii!!!!, por tu idealismo y por saber si estoy bien o mal aunque no te lo cuente; ojalá no te hubieses ido. Abuelo, gracias por haber sido un ejemplo de vida hasta el último día. A Tere, gracias por preocuparte siempre por nosotros en algunos casos como una madre. Al resto de la familia, tíos y primos gracias también porque entre todos habéis hecho posible que yo llegue hasta aquí.

*...Y un juego vil
que no hay que jugarlo a ciegas,
pues juegas cien veces, mil,
y de las mil, ves febril
Que o te pasas o no llegas.
Y el no llegar da dolor(...),
Mas ¡ay de ti si te pasas!
¡Si te pasas es peor!*

(La Venganza de Don Mendo, Pedro Muñoz Seca)

ÍNDICE

I.	ÍNDICE	1
II.	ABREVIATURAS	11
III.	SUMMARY.....	15
IV.	RESUMEN	17
V.	INTRODUCCIÓN	19
1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS	19
1.1.	Clasificación taxonómica	19
1.2.	Enfermedades causadas por CoVs. Importancia socioeconómica.....	20
1.3.	Estructura del virión	21
1.4.	Estructura del genoma y expresión génica	24
1.5.	Ciclo infectivo	26
2.	EL COMPLEJO DE REPLICACIÓN- TRANSCRIPCIÓN (RTC) EN CoVs	27
2.1.	Formación del RTC.....	28
2.2.	El núcleo del RTC.....	29
2.2.1.	La proteína nsp14. Sistema de corrección de errores en CoVs	31
2.3.	Otras proteínas de la replicasa	32
2.4.	Síntesis del 5'cap en CoVs.....	32
3.	VECTORES VIRALES	34
3.1.	Vectores basados en genomas de CoVs	35
3.1.1.	Sistemas de genética reversa en CoVs	35
3.1.2.	Expresión de proteínas heterólogas en CoVs	36
3.2.	Tropismo de CoVs	37
3.3.	Atenuación de CoVs.....	38
4.	EL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (PRRS)	38
4.1.	Historia y características de la enfermedad.....	38
4.2.	El PRRSV.....	39
4.3.	Respuesta inmune y protección frente al PRRSV.....	40
4.4.	Vacunas frente al PRRSV.....	42
5.	RESPUESTA INMUNE INNATA	43
5.1.	Respuesta antiviral activada por RNA de doble cadena	43
5.2.	Mecanismos para contrarrestar la respuesta antiviral mediada por dsRNA en CoVs	45

VI. OBJETIVOS.....	47
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. CÉLULAS EUCARIOTAS	49
1.1. Líneas celulares.....	49
1.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas.....	49
1.3. Obtención de cultivos primarios de macrófagos porcinos	50
1.4. Sincronización de cultivos celulares	51
2. VIRUS	51
2.1. Aislados virales	51
2.2. Crecimiento y titulación de virus en cultivos celulares	51
2.3. Purificación parcial de los virus TGEV y PRRSV.....	53
3. BACTERIAS	53
3.1. Cepas y cultivos de bacterias.....	53
3.2. Preparación de bacterias competentes.....	54
3.3. Transformación de bacterias mediante electroporación	54
4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA.....	54
4.1. Plásmidos.....	54
4.2. Manipulación y purificación de plásmidos	55
4.3. Enzimas de restricción y modificación del DNA.....	55
4.4. Amplificación de DNA mediante PCR	55
4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	56
5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	56
5.1. Construcción de plásmidos para la introducción de genes heterólogos en el clon infectivo del rTGEV	56
5.2. Construcción de plásmidos para la mutagénesis de la proteína nsp14.....	59
6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA	60
6.1. Extracción y purificación del RNA total intracelular	60
6.2. Análisis del RNA mediante RT-PCR	60
6.3. Cuantificación de RNAs mediante RT-qPCR.....	61
7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS Y RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES	62
7.1. Experimentos de transfección de replicones del TGEV	62
7.2. Transfección y rescate de virus infecciosos a partir de clones de cDNA	63
7.3. Transfección con el análogo de dsRNA poly(I:C)	63
8. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE SECUENCIAS HETERÓLOGAS EN EL GENOMA DEL rTGEV	64
9. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	65
9.1. Purificación de proteínas a partir de baculovirus recombinantes.....	65

9.2. Generación de antisueros específicos para las proteínas nsp14 del TGEV y GP4 del PRRSV	66
9.3. Inmunomicroscopía de fluorescencia indirecta (inmunofluorescencia)	66
9.4. Inmunodetección de proteínas (<i>Western Blot</i>)	67
10. ENSAYO DE PROTECCIÓN EN CERDO	68
10.1. Declaración ética	68
10.2. Inmunización y desafío de cerdos	68
10.3. Seguimiento de la enfermedad y toma de muestras	69
10.4. Extracción de RNA de pulmón	69
10.5. Extracción de RNA viral de suero y determinación de viremia.....	70
10.6. Evaluación de citoquinas en suero de cerdo	71
10.7. Inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA)	71
10.8. Evaluación de la capacidad de neutralización de sueros.....	72
10.9. Análisis histopatológico	72
11. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL TGEV	73
12. MODELADO DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS	75
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	75

VIII. RESULTADOS77

1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL PRRSV CON VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV	77
1.1. Expresión de las proteínas GP4 y M del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV	78
2. AUMENTO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL PRRSV POR VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV	81
2.1. Aumento de los niveles de expresión de mRNA y proteína.....	81
2.2. Efecto del aumento de los niveles de expresión sobre la estabilidad del gen heterólogo	84
3. AUMENTO DE LA ESTABILIDAD DE LOS VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS DEL PRRSV	86
3.1. Expresión del fragmento GP5ecto	86
3.2. Análisis de las secuencias heterólogas eliminadas en los rTGEVs después de los pases	88
3.3. Expresión del fragmento GP5fr.....	89
3.4. Expresión de los fragmentos GP3fr y GP4fr.....	91
3.5. Expresión de dominios de proteínas del virus de la peste porcina clásica (CSFV) con vectores basados en el genoma del rTGEV	93
4. EXPRESIÓN DE DOMINIOS ANTIGÉNICOS DEL PRRSV UTILIZANDO LA PROTEÍNA M DEL PRRSV COMO MATRIZ.....	95

4.1. Diseño de proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop y expresión con vectores basados en el genoma del rTGEV	95
4.2. Análisis de la estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan las construcciones quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop	97
5. PROTECCIÓN FRENTE A PRRSV INDUCIDA POR VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV QUE EXPRESAN ESTABLEMENTE ANTÍGENOS DEL PRRSV	100
5.1. Evaluación de los síntomas clínicos	100
5.2. Evaluación del daño pulmonar	101
5.3. Evaluación de la carga viral.....	103
5.4. Análisis de la respuesta inmune frente al PRRSV inducida por vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan establemente antígenos del PRRSV	104
5.4.1. Respuesta inmune humoral.....	104
5.4.2. Evaluación de citoquinas circulantes en suero	106
6. ATENUACIÓN DE VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV MEDIANTE MUTACIONES EN GENES DE LA REPLICASA	108
6.1. Generación de replicones del TGEV mutantes en la proteína nsp14	108
6.2. Análisis del requerimiento de la actividad ExoN para la viabilidad del TGEV	113
6.3. Análisis del requerimiento de la actividad N7-MTasa para la viabilidad del TGEV	117
6.4. Generación de rTGEVs mutantes en el dominio ZF1 de la proteína nsp14	120
6.4.1. Caracterización del virus mutante en el dominio ZF1 de la proteína nsp14 rTGEV-ZF-C en cultivos celulares	120
6.4.2. Caracterización de la respuesta antiviral inducida por el virus mutante rTGEV-ZF-C	122
6.4.3. Acumulación de dsRNA en células infectadas por el virus mutante rTGEV-ZF-C	126
6.4.4. Modulación de la respuesta inmune innata por la proteína nsp14-ZF-C	128
IX. DISCUSIÓN	133
1. ESTABILIDAD DE VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DE CoVs.....	133
2. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL PRRSV	138
3. REQUERIMIENTO DE DIFERENTES DOMINIOS DE LA PROTEÍNA NSP14 PARA LA VIABILIDAD DEL TGEV	140
4. PAPEL DE LA PROTEÍNA NSP14 EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA	143
X. CONCLUSIONES	149

XI. BIBLIOGRAFÍA.....	151
------------------------------	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía del orden <i>Nidovirales</i>	19
Figura 2. Estructura del virión del TGEV	22
Figura 3. Modelo de transcripción en CoVs	25
Figura 4. Ciclo infectivo de CoVs.....	27
Figura 5. Estructura del genoma del TGEV y de las poliproteínas de la replicasa	28
Figura 6. Complejo de replicación- transcripción en CoVs	29
Figura 7. Ruta de síntesis del 5'cap en CoVs.....	33
Figura 8. Respuesta antiviral activada por dsRNA	44
Figura 9. Recta patrón para la estimación del título del PRRSV virulento en suero	70
Figura 10. Expresión de las proteínas GP4 y M del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV	79
Figura 11. Estabilidad genética de los vectores basados en el genoma del rTGEV que codifican las proteínas GP4 y M del PRRSV.....	81
Figura 12. Diseño de módulos de expresión para aumentar los niveles de expresión de la proteína M del PRRSV	82
Figura 13. Expresión de la proteína M del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV bajo el control de distintos mecanismos reguladores	83
Figura 14. Estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV que controlan la expresión de la proteína M del PRRSV mediante distintas secuencias reguladoras de la transcripción	85
Figura 15. Expresión del fragmento GP5ecto de la proteína GP5 del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV	87
Figura 16. Análisis de los clones inestables aislados en el pase 8	88
Figura 17. Expresión del fragmento GP5fr de la proteína GP5 del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV.....	89
Figura 18. Estabilidad genética a largo plazo de los vectores basados en el genoma del rTGEV que codifican fragmentos de la proteína GP5 del PRRSV	91
Figura 19. Expresión de los fragmentos GP3fr y GP4fr con vectores basados en el genoma del rTGEV	92

Figura 20. Expresión de los fragmentos E2-A y E2-BC con vectores basados en el genoma del rTGEV	94
Figura 21. Proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop y expresión con vectores basados en el genoma del rTGEV	96
Figura 22. Estabilidad y detección de la expresión de las proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop con vectores basados en el genoma del rTGEV	98
Figura 23. Protocolo de evaluación <i>in vivo</i> de vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan proteínas del PRRSV	100
Figura 24. Protección frente a los síntomas clínicos causados por el PRRSV en los animales inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV	101
Figura 25. Histopatología de pulmón en los animales inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV	102
Figura 26. Efecto de la inmunización con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV en la infección con el PRRSV.....	103
Figura 27. Respuesta humoral inducida por la inmunización con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV	105
Figura 28. Respuesta de anticuerpos neutralizantes en animales inmunizados y no inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV.....	106
Figura 29. Citoquinas circulantes en el suero en animales inmunizados y no inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV.....	107
Figura 30. Motivos estructurales y funcionales de la proteína nsp14 del TGEV.....	109
Figura 31. Generación de replicones del TGEV con mutaciones en la proteína nsp14	111
Figura 32. Efecto de la introducción de mutaciones en la proteína nsp14 en la síntesis de RNA por replicones del TGEV	113
Figura 33. Síntesis de RNA por mutantes del rTGEVs en el centro activo de la actividad ExoN.....	114
Figura 34. Síntesis de proteínas por mutantes del rTGEV en el centro activo de la ExoN....	116
Figura 35. Impacto de la mutación en el domino de unión a SAM de la proteína nsp14 en la síntesis de proteínas virales	118

Figura 36. Estabilidad de la mutación en el domino de unión a SAM de la proteína nsp14	119
Figura 37. Crecimiento del virus mutante rTGEV-ZF-C en cultivos celulares.....	121
Figura 38. Cinética de acumulación de gRNA por el virus mutante rTGEV-ZF-C	122
Figura 39. Activación de caspasas durante la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C...	123
Figura 40. Inducción de la respuesta inmune innata en la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C	124
Figura 41. Inducción de la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) en la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C.....	125
Figura 42. Acumulación de dsRNA en células infectadas con el virus mutante rTGEV-ZF-C	127
Figura 43. Inducción de la respuesta antiviral en células infectadas con el virus mutante rTGEV-ZF-C con dsRNA exógeno	129
Figura 44. Modulación de la respuesta antiviral inducida en células infectadas con el rTGEV-WT por la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C.....	130
Figura 45. Modelo del papel de la actividad de la proteína nsp14 y otras proteína de CoV en la inhibición de la respuesta antiviral	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Géneros y especies representativos de la subfamilia <i>Coronaviridae</i>	20
Tabla II. Estructura de las proteínas de fusión de PRRSV expresadas por vectores basados en el genoma del rTGEV.....	57
Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de proteínas heterólogas en el clon infectivo del rTGEV.....	57
Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de la proteína nsp14.....	60
Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de RNAs virales mediante RT-qPCR	62
Tabla VI. Ensayos TaqMan® utilizados para el análisis de genes celulares por RT-qPCR.....	62
Tabla VII. Tamaño de banda y oligonucleótidos empleados en el análisis de la estabilidad de los vectores basados en el rTGEV por RT-qPCR.....	64
Tabla VIII. Anticuerpos primarios utilizados	67
Tabla IX. Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del genoma del TGEV	73

ABREVIATURAS

2'-O-Mtasa	2'-O-ribosa metiltransferasa
ADE	amplificación dependiente de anticuerpos
ADRP	adenosina difosfato ribosa fosfatasa
AIM	proteína ausente en el melanoma
ATP	adenosín trifosfato
BAC	cromosoma artificial de bacteria
BHK	línea celular de riñón de hámster
bp	pares de bases
BSA	albúmina de suero bovina
cDNA	copia de DNA
CMV	citomegalovirus
CoV	coronavirus
CS	hexanucleótido central conservado
CSFV	virus de la peste porcina clásica
CTD	dominio C-terminal
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DDX	helicasa tipo <i>DEAD box</i>
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DMV	vesícula de doble membrana
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTPasa	hidrolasa de desoxinucleótidos trifosfato
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	ditiotreitól
ECN	epítipo crítico en neutralización
ecto	ectodominio
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas
ER	retículo endoplasmático
ERGIC	compartimento intermedio
ExoN	exonucleasa
FBS	suero fetal bovino
fr	fragmento
GFP	proteína fluorescente verde
GMP	guanosina monofosfato
GOLGI	aparato de Golgi
GP	glicoproteína
gRNA	RNA génomico
GTasa	guanilil transfersa
GUSB	beta-glucuronidasa
HCoV	coronavirus humano
hpi	horas después de la infección
hpt	horas después de la transfección
HRP	peroxidasa del rábano picante

IBV	virus de la bronquitis infecciosa
IF	inmunofluorescencia
IFN	interferón
IL	interleuquina
IMAC	cromatografía de afinidad a metales pesados
IRF	factor regulador del interferón
ISG	gen inducido por interferón
JEV	virus de la encefalitis japonesa
LB	medio Luria-Bertani
mAb	anticuerpo monoclonal
MAVS	proteína mitocondrial de señalización antiviral
MDA5	gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma
MERS-CoV	coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHV	virus de la hepatitis de ratón
moi	multiplicidad de infección
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
M ^{pro}	proteasa principal
mRNA	RNA mensajero
N7-MTasa	N7- metiltransferasa
NendoU	endonucleasa
NFκB	factor nuclear kappa B
NiRNA	RNA nucleotidil-transferasa
nsp	proteína no estructural
nt	nucleótido
NTD	domino N-terminal
NTPasa	hidrolasa de nucleótidos trifosfato
OAS	2'-5' oligoadenilato sintetasa
ORF	fase de lectura abierta
pAb	anticuerpo policlonal
PAMP	patrón molecular asociado a patógeno
pAPN	aminopeptidasa N porcina
PBMC	célula mononuclear de sangre periférica
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDCoV	coronavirus porcino
PEDV	virus de la diarrea epidémica porcina
PFA	paraformaldehído
pfu	unidades formadoras de placas
PKR	quinasa dependiente de dsRNA
PLP	proteasa similar a papaína
poliA	poliadenina
poly (I:C)	ácido poli-inosínico:poli-citidílico
pp	poliproteína
PRCV	coronavirus respiratorio porcino
PRRS	síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PRRSV	virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RIG-I	gen I inducible por ácido retinoico
RLR	receptor tipo RIG-I
RLT	tampón de lisis para RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RPMI	medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS	sentido reverso
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa
RTC	complejo de replicación-transcripción
rTGEV	virus recombinante de la gastroenteritis porcina transmisible
RTPasa	RNA trifosfatasa
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SARS	síndrome respiratorio agudo y grave
SARS-CoV	coronavirus del síndrome respiratorio agudo y grave
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
SFV	virus del bosque de Semilki
sgmRNA	RNA mensajero subgenómico
sgRNA	RNA subgenómico
SP	superposición
SPep	péptido señal
ssRNA	RNA de cadena sencilla
ST	línea celular epitelial de testículo de cerdo
TBS	tampón salino con tris-clorhídrico
TCID ₅₀	dosis infectante del 50% en cultivos celulares
TGEV	virus de la gastroenteritis porcina transmisible
TGFβ	factor de crecimiento tumoral β
TLR	receptor tipo toll
TM	transmembrana
Tm	temperatura de hibridación
TNF	factor de necrosis tumoral
TRM	motivo regulador de la transcripción
TRM ^{opt}	motivo regulador de la transcripción optimizado
TRS	secuencia reguladora de la transcripción
TTBS	tampón salino con tris-clorhídrico y tween 20
U	unidades
UI	unidades internacionales
UTR	región no traducida
UV	ultravioleta
VEE	virus de la encefalitis venezolana
VLP	partícula similar a virus
VS	sentido viral
WB	<i>Western blot</i>

WT	tipo silvestre
YFV	virus de la fiebre amarilla
ZF	dedo de zinc

SUMMARY

Coronaviruses (CoVs) are positive-stranded RNA viruses with potential as immunization vectors, expressing high levels of heterologous genes and eliciting both secretory and systemic immune responses. Nevertheless, its high recombination rate may result in the loss of the foreign gene, limiting their use as vectors. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) was engineered to express porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigenic protein domains. rTGEV-derived vectors stability was systematically analyzed to determine the relevance of several factors, such as protein domain size or protein expression levels, on vector stability. After serial passage in tissue cultures, stable expression of small PRRSV protein antigenic domains was achieved. Another strategy to express antigenic domains with rTGEV-derived vectors was the use of PRRSV M protein, whose expression with rTGEV vectors was totally stable, as an scaffold to expose small protein domains. Both strategies, size reduction of the heterologous gene and using M protein as an scaffold, were successful to obtain stable expression of the heterologous antigens with rTGEV-derived vectors. Immunization of piglets with these TGEV vectors led to partial protection against a challenge with a virulent PRRSV strain, as immunized animals showed reduced clinical signs and lung damage. Additionally, CoV non structural protein 14 (nsp14) was studied as a target to achieve vector attenuation by innate immune response modulation. CoV nsp14 is a 60 kDa protein encoded by the replicase gene that is part of the replication-transcription complex. It is a bifunctional enzyme bearing 3'-5' exoribonuclease (ExoN) and guanine-N7-methyltransferase (N7-MTase) activities. ExoN hydrolyzes single- and double-stranded RNAs and is part of a proofreading system responsible for the high fidelity of CoV replication. Nsp14 N7-MTase activity is required for viral mRNA 5'cap synthesis, which is required for protein translation and prevents the recognition of viral mRNAs as "non-self" by the host cell. A set of mutants affecting different nsp14 domains was generated, using TGEV as a model of *Alphacoronavirus*. Most of the mutants showed defects in RNA synthesis, with a moderate decrease of the replication levels and a strong to total reduction of transcription levels, confirming the essential role of nsp14 protein during CoV RNA synthesis. Mutants lacking ExoN activity were non-viable despite being competent in both viral RNA and protein synthesis. The mutant lacking N7-MTase activity was recovered, although revertants were rapidly imposed within the population. A specific mutation within the zinc finger 1 (ZF-C) led to a viable virus with growth and viral RNA synthesis kinetics similar to that of the parental virus. Mutant rTGEV-ZF-C virus caused decreased cytopathic

effect and apoptosis compared with the wild-type virus, and reduced levels of dsRNA accumulation at late times post-infection. Consequently, the mutant triggered a reduced antiviral response, which was confirmed by evaluating different stages of the dsRNA-induced antiviral pathway. The expression of IFN- β , TNF, and interferon-stimulated genes in cells infected with mutant rTGEV-ZF-C was reduced when compared to the parental virus. Overall, these data revealed a new role for CoV nsp14 in modulation of the innate immune response.

RESUMEN

Los coronavirus (CoVs) son virus con un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Estos virus son prometedores sistemas de expresión de genes heterólogos para su uso como vectores vacunales dado que expresan altos niveles de las proteínas heterólogas y promueven inmunidad secretora y sistémica. Sin embargo, su uso se ve limitado por la alta tasa de recombinación en CoVs, que causa inestabilidad en los vectores, resultando en la pérdida de los genes heterólogos. El virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) se usó como vector para la expresión de dominios antigénicos de proteínas del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). La estabilidad de estos vectores se analizó sistemáticamente para determinar la relevancia en la estabilidad del vector de factores como el tamaño del inserto heterólogo o los niveles de expresión de la proteína. Se consiguieron vectores estables que expresaban dominios antigénicos de pequeño tamaño de las proteínas del PRRSV. Asimismo, se utilizó la proteína M del PRRSV, cuya expresión con vectores basados en el genoma del TGEV fue totalmente estable, como matriz para la exposición de pequeños dominios antigénicos. La reducción en el tamaño del inserto heterólogo y el empleo de la proteína M del PRRSV como matriz resultaron estrategias útiles para la obtención de vectores estables basados en el genoma del rTGEV. La inmunización de lechones con estos vectores indujo protección parcial frente a los signos clínicos de la enfermedad después del desafío con una cepa virulenta del PRRSV. Por otra parte, la proteína no estructural 14 (nsp14) se estudió como posible diana para la atenuación y modulación de la respuesta inmune innata de los vectores derivados de CoVs. La proteína nsp14, codificada en el gen de la replicasa, es una proteína de 60 KDa que forma parte del complejo de replicación-transcripción. La proteína nsp14 es bifuncional, con actividad exonucleasa (ExoN) y guanina- N7-metiltransferasa (N7-MTasa). La actividad ExoN hidroliza RNA de cadena sencilla y doble, y actúa como sistema de corrección de errores, responsable de la alta fidelidad de la replicación de CoVs. La actividad N7-MTasa está implicada en la síntesis del 5'cap, requerido para la traducción y para evitar la activación de la respuesta antiviral. Se generó un conjunto de mutantes en distintos motivos de la proteína nsp14 de TGEV, como modelo de *Alfacoronavirus*. La mayoría de los mutantes generados mostraron defectos en la síntesis de RNA, con una reducción moderada de la replicación y drástica en transcripción, confirmando un papel esencial de la nsp14 en la síntesis de RNA en CoVs. Los mutantes que carecían de actividad ExoN no fueron viables, a pesar de sintetizar RNAs y proteínas virales. El mutante sin actividad N7-MTasa se rescató, aunque rápidamente

aparecían revertientes que se imponían en la población. Una mutación en el motivo *zinc finger* 1 (ZF-C) produjo un virus viable con cinéticas de crecimiento y síntesis de RNA similares a las del virus silvestre. El virus mutante rTGEV-ZF-C producía un efecto citopático y apoptosis menores que los del virus parental. La acumulación de RNA de doble cadena (dsRNA) en la infección con el virus rTGEV-ZF-C fue significativamente menor que en el caso del virus parental, y por consiguiente inducía una reducida respuesta antiviral. La evaluación de diversas etapas de la respuesta antiviral mostró que la expresión de IFN- β , TNF, y genes estimulados por interferón (ISGs) era menor en las células infectadas con el rTGEV-ZF-C, en comparación con el virus silvestre. En conjunto, los datos obtenidos indicaron que la proteína nsp14 tiene una función adicional en la modulación de la respuesta inmune innata.

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS

1.1. Clasificación taxonómica

Los coronavirus (CoVs) son virus con envuelta que contienen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que, junto con los miembros de la subfamilia *Torovirinae*, constituyen la familia *Coronaviridae*. Ésta se engloba dentro del orden *Nidovirales*, cuya característica común es la producción de mRNAs subgenómicos 3' coterminales o anidados, lo que da nombre al orden (Enjuanes y col., 2008; de Groot y col., 2012).

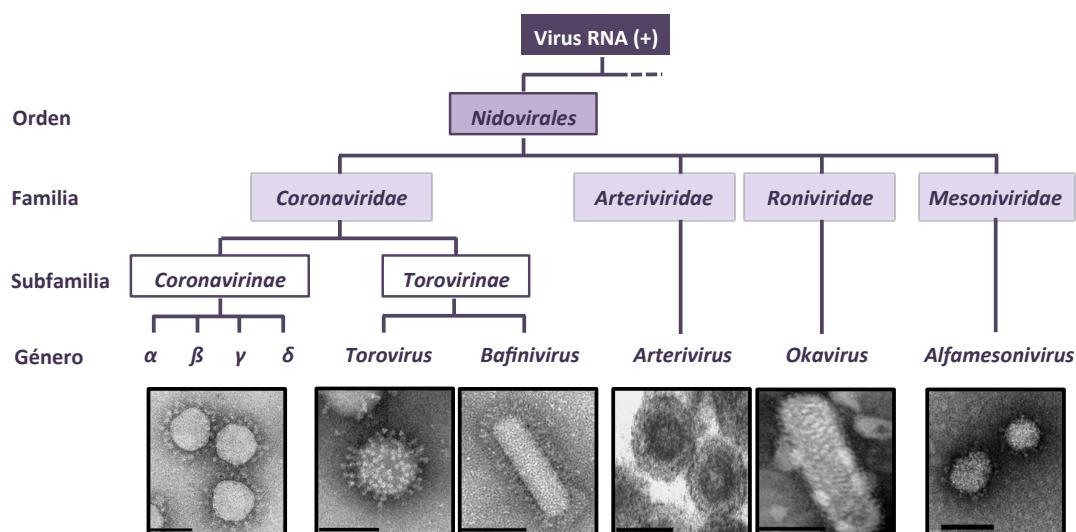


Figura 1. Taxonomía del orden *Nidovirales*. Esquema del orden *Nidovirales*, indicando las familias, subfamilias y géneros. En la parte inferior se muestran micrografías electrónicas de virus representativos de los distintos géneros. Barra, 50 nm.

Los nidovirus infectan un amplio rango de hospedadores, y junto a la familia *Coronaviridae* incluyen a las familias *Arteriviridae*, *Roniviridae* y *Mesoniviridae* (Fig. 1) (de Groot y col., 2012). La familia *Arteriviridae*, constituida por el género *Arterivirus* incluye especies que infectan a mamíferos como el virus causante del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) (Snijder y Spaan, 1995; Lunney y col., 2010). Los virus de las familias *Roniviridae* y *Mesoniviridae* infectan invertebrados como gambas o mosquitos (Walker y col., 2005; Lauber y col., 2012). Dentro de la familia *Coronaviridae*, la subfamilia *Torovirinae* está formada por los géneros *Torovirus* y *Bafinivirus* que infectan mamíferos y peces, respectivamente. La subfamilia *Coronavirinae* está constituida por los géneros *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (α , β , γ , y δ ,

respectivamente), e incluye más de 20 especies que infectan a un amplio rango de vertebrados, incluyendo mamíferos y aves (Tabla I) (de Groot y col., 2013).

TABLA I. Géneros y especies representativos de la subfamilia *Coronavirinae*

GÉNERO	ESPECIE	DESIGNACIÓN	HOSPEDADOR	ENFERMEDAD
α	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	TGEV	Cerdo	Enteritis
	CoV respiratorio porcino	PRCV	Cerdo	Respiratoria
	CoV humano 229E	HCoV-229E	Humano	Respiratoria
	Virus de la diarrea epidémica porcina	PEDV	Cerdo	Enteritis
	CoV humano NL63	HCoV-NL63	Humano	Neumonía
β	Virus de la hepatitis de ratón	MHV	Ratón	Hepatitis
	CoV humano OC43	HCoV-OC43	Humano	Enteritis
	CoV del SARS	SARS-CoV	Humano	Neumonía
	CoV del MERS	MERS-CoV	Humano	Neumonía Nefritis
γ	Virus de la bronquitis infecciosa	IBV	Pollo	Respiratoria
	CoV de la ballena beluga SW1	BWCoV-SW1	Beluga	Desconocido
δ	CoV del bulbul HKU11	BuCoV-HKU1	Bulbul	Desconocido
	CoV porcino	PDCoV	Cerdo	Enteritis

1.2. Enfermedades causadas por CoVs. Importancia socioeconómica

Los CoVs humanos son responsables del 10-20% de los resfriados comunes, causados principalmente por los CoVs HCoV-229E, HCoV-OC43 y HCoV-NL63, que ocasionalmente pueden derivar en enfermedades pulmonares más graves en recién nacidos, personas mayores o individuos inmunodeprimidos (Garbino y col., 2006). En el año 2002, la emergencia del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS), que se diagnosticó en 8422 enfermos de 30 países y dejó un balance de 916 fallecidos, atrajo la atención mediática y científica hacia los CoVs y llevó a la identificación de nuevos CoVs humanos (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003; Stadler y col., 2003). Desde entonces, se han descrito otros CoVs en humanos, como el HCoV-NL63 y el coronavirus humano HKU1 (HCoV-HKU1), causantes de bronquiolitis y neumonías relativamente graves (van der Hoek y col., 2004; Woo y col., 2005). En 2012 emergió un nuevo CoV humano, el virus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Annan y col., 2013; Assiri y col., 2013). Este CoV produce neumonías graves acompañadas ocasionalmente de patología renal. Este virus ha causado hasta este momento 1599 casos con más de 500 muertes

(http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/, 20 Octubre de 2015). En murciélagos se han identificado antecesoros comunes recientes de los CoVs de los géneros α y β , incluyendo CoVs muy similares al SARS-CoV y al MERS-CoV lo que sugiere que los murciélagos constituyen el reservorio natural de los CoVs (Dominguez y col., 2007; Gloza-Rausch y col., 2008; Tong y col., 2009; Annan y col., 2013). Las últimas zoonosis causadas por CoVs indican que estos virus tienen facilidad para atravesar la barrera de especie, lo cual refuerza la relevancia de los CoVs como patógenos humanos emergentes (Graham y col., 2013; Coleman y Frieman, 2014).

En animales, los CoVs generan importantes pérdidas económicas en explotaciones ganaderas, además de infectar animales de compañía y animales de experimentación (Cavanagh, 2005; Lai y col., 2007; Perlman y Netland, 2009). Recientemente, CoVs porcinos re-emergentes como el PEDV y el PDCoV han causado patologías muy graves que han llevado a enormes pérdidas económicas de, por ejemplo, el 10% de la cabaña porcina de EE.UU. en un año de epidemia (Jung y Saif, 2015).

El TGEV, modelo de estudio utilizado en esta tesis, pertenece al género *Alfacoronavirus* y produce una enteritis muy contagiosa en cerdos recién nacidos, con índices de mortalidad del 80-100% (Kim y col., 2000). La enfermedad, descrita por primera vez en EE.UU. (Doyle y Hutchings, 1946), se ha identificado en la mayoría de los países europeos así como en América Central y del Sur, Canadá y en diversos países asiáticos (Saif y Sestak, 2006). Actualmente, la mayor parte del ganado porcino europeo presenta inmunidad parcial frente al TGEV debido a la diseminación de un mutante natural atenuado, el PRCV, que no produce síntomas clínicos relevantes (Wesley y col., 1991; Enjuanes y Van der Zeijst, 1995; Pensaert y Van Reeth, 1998). Sin embargo, la enfermedad continúa causando graves problemas económicos para los productores del ganado porcino, particularmente en granjas seronegativas de EE.UU., América Central, Rusia y China (OIE; Woods y Wesley, 1998).

1.3. Estructura del virión

Los CoVs son virus esféricos, de entre 120 y 160 nm de diámetro, que presentan una envuelta lipídica en la que se inserta un conjunto de proteínas estructurales comunes a todos los CoVs: la proteína de la espícula (S), la proteína de membrana (M) y la proteína de la envuelta (E) (de Groot y col., 2012). Además, algunos *Betacoronavirus* presentan en la envuelta viral otras proteínas específicas de especie, como las proteínas accesorias 3a, 6, 7a

y 7b en el caso del SARS-CoV (Shen y col., 2005; Huang y col., 2006; Huang y col., 2007; Schaecher y col., 2007), o una proteína homóloga a la hemaglutinina en el MHV (Brian y Baric, 2005). En el interior del virión se encuentra la nucleocápsida, formada por el RNA genómico (gRNA) unido a la proteína de la nucleocápsida (N) (Fig. 2A) (de Groot y col., 2012).

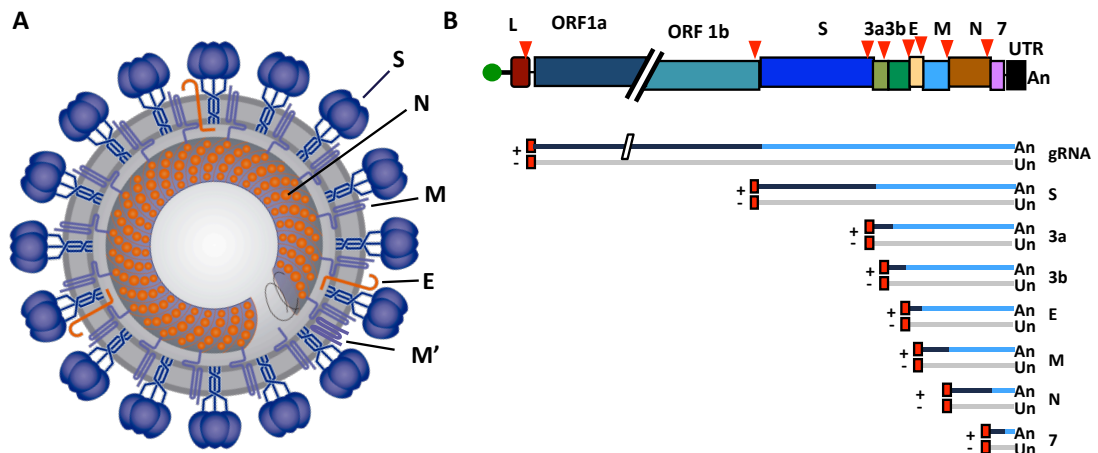


Figura 2. Estructura del virión del TGEV. (A) Modelo estructural de la partícula viral en la que se distinguen dos dominios estructurales: la envuelta lipídica en la que se insertan las proteínas S, E y M (en conformaciones M y M') y la nucleocápsida helicoidal formada por el genoma RNA asociado a la proteína N. (B) En la parte superior se muestra el esquema del genoma del TGEV, incluyendo la estructura 5'cap (verde), la secuencia leader (L) y los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3a, 3b, E, M, N y 7), la región 3' no traducida (UTR) y la cola de poliadenina (An). Los triángulos rojos invertidos en la parte superior representan las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS). En la parte inferior se muestran los RNAs subgenómicos (sgRNAs) resultantes de la transcripción. Se indica su polaridad y estructuras terminales comunes. Las secuencias leader y antileader se muestran en rojo. En azul oscuro se muestra la parte que se traduce de cada mRNA subgenómico.

La proteína S es una glicoproteína de membrana de tipo I de 150-200 KDa. Funcionalmente se ensambla formando trímeros que constituyen las espículas, que son las estructuras más prominentes de la envuelta viral y confieren al virión su aspecto de corona, responsable del nombre de la familia (Delmas y Laude, 1990). La proteína S media la unión del virión al receptor celular, permitiendo la entrada del virus en las células (Gallagher y Buchmeier, 2001; Belouzard y col., 2012). De acuerdo con esta función, esta proteína es la responsable de la especificidad en el tropismo de tejido y de especie, y la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Delmas y col., 1986; Jimenez y col., 1986; Enjuanes y col., 1987; Sanchez y col., 1990).

La proteína M es una glicoproteína de 29 a 36 KDa, y es el componente estructural más abundante del virión (Sturman y Holmes, 1977; Sturman y col., 1980). Presenta un pequeño

dominio N-terminal orientado hacia el exterior del virión, tres dominios transmembrana y un dominio C-terminal orientado hacia el interior del virión, que interacciona con la proteína N. En el TGEV, la proteína M se pliega también en una segunda conformación con los extremos N- y C-terminales orientados hacia el exterior de la partícula viral (Escors y col., 2001). La proteína M es fundamental en los procesos de morfogénesis y ensamblaje de los CoVs (Nguyen y Hogue, 1997; Corse y Machamer, 2003; Arndt y col., 2010). Esta proteína también induce la producción de anticuerpos neutralizantes aunque en menor grado que la proteína S (Jimenez y col., 1986).

La proteína E es una proteína transmembrana de unos 10 KDa que se encuentra en los viriones en un número bajo de copias (20 moléculas/ virión), pero se acumula abundantemente en la célula infectada donde participa, junto con la proteína M, en el ensamblaje y liberación de los viriones (Nguyen y Hogue, 1997; Maeda y col., 2001; Nieto-Torres y col., 2011; Ruch y Machamer, 2012). Su requerimiento es variable dependiendo de la especie de CoV. En el caso del TGEV y del MERS-CoV la eliminación de la proteína E resulta en virus competentes en replicación pero deficientes en propagación, mientras que en el MHV o el SARS-CoV, la proteína E no es esencial para la maduración y secreción de partículas infectivas (Ortego y col., 2002; DeDiego y col., 2011; Almazan y col., 2013). La proteína E forma canales iónicos y es un factor de virulencia que modula la respuesta celular a estrés de retículo y la inflamación (DeDiego y col., 2011; Verdia-Baguena y col., 2012; Jimenez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2015; Surya y col., 2015).

La proteína N es una fosfoproteína de unos 40 KDa que se une al gRNA viral para formar la nucleocápsida helicoidal (Laude y Masters, 1995). Esta proteína presenta una organización modular con dos dominios estructurados N-terminal (NTD) y C-terminal (CTD) separados por regiones desordenadas. Se han identificado dominios de unión al RNA en la región NTD mientras que el CTD es necesario para la oligomerización, esencial para conferir estabilidad a la nucleocápsida (Chang y col., 2006; Zuñiga y col., 2007). Además de su función estructural, la proteína N tiene actividad chaperona de RNA (Zuñiga y col., 2007; Zuñiga y col., 2009) y desempeña un papel fundamental en la síntesis de RNA viral (Almazan y col., 2004; Schelle y col., 2005). En particular, nuestro grupo ha descrito que la proteína N es esencial para la transcripción de CoVs, probablemente porque facilita el cambio de molde durante este proceso (Zuñiga y col., 2010). Además, la proteína N desempeña múltiples funciones en la

interacción virus-hospedador, modulando numerosos procesos celulares (Surjit y Lal, 2008; McBride y col., 2014).

1.4. Estructura del genoma y expresión génica

El genoma de los CoVs consiste en una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con un tamaño que varía entre 28 y 30 kb, lo que representa el genoma viral RNA de mayor tamaño conocido (Snijder y col., 2003; Gorbalenya y col., 2006; Enjuanes y col., 2008; de Groot y col., 2012). Estructuralmente se asemeja a los mRNAs eucariotas celulares, dado que posee una estructura de 7-metil-guanosina o 5'cap en el extremo 5', una cola de poliadenina en el extremo 3', y regiones no traducidas en ambos extremos (5' UTR y 3'UTR) (Jacobs y col., 1986; Page y col., 1990; Brian y Baric, 2005).

La organización básica del genoma es común a todos los miembros del orden *Nidovirales* (Fig. 2B). En CoVs, los dos tercios 5' terminales codifican la replicasa viral, constituida por dos fases abiertas de lectura (ORFs) solapantes, ORF1a y ORF1b, que se traducen directamente a partir del RNA genómico al comienzo de la infección, dando lugar a dos poliproteínas, pp1a y pp1ab (Thiel y col., 2003a). Ambas poliproteínas son co-amino terminales, dado que la pp1ab se traduce mediante un salto de fase del ribosoma que tiene lugar en la región de solapamiento de las dos ORFs y permite evitar el codón de terminación de la ORF1a (Brierley y col., 1989). Estas poliproteínas se autoproteolizan para dar lugar a 16 proteínas no estructurales (nsps) (Ziebuhr, 2005). El tercio 3' terminal del genoma contiene los genes estructurales en el orden 5'-S-E-M-N-3', y los genes específicos de grupo, cuyo número, posición y secuencia varía dependiendo de la especie de CoV (Masters, 2006; de Groot y col., 2012). En el caso del TGEV existen tres genes específicos de grupo, los genes 3a y 3b localizados entre las proteínas S y E, y el gen 7 que ocupa la posición 3' terminal (Fig. 2B). Los genes 3a y 3b no son esenciales para la replicación en cultivos celulares e *in vivo*, y su eliminación no afecta a la virulencia del virus (Sola y col., 2003; Curtis y col., 2004). Todos los vectores derivados del TGEV generados durante esta tesis carecen de estos genes, y los antígenos heterólogos se expresan desde las posiciones previamente ocupadas por los genes 3a y 3b. El gen 7 también es dispensable para la replicación *in vitro*, pero a diferencia de los anteriores tiene relevancia en virulencia dado que actúa contrarrestando la respuesta antiviral del huésped mediante su asociación con la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 celular (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013).

Todos los genes del tercio 3' terminal del genoma se expresan a partir de una colección de mRNAs subgenómicos (sgmRNA) de distintos tamaños, coterminales en sus extremos 5' y 3'. Estos sgmRNAs son estructuralmente policistrónicos pero funcionalmente monocistrónicos dado que, por lo general, únicamente se traduce la ORF más cercana al extremo 5' (Fig. 2B) (Masters, 2006). Estos sgmRNAs presentan en su extremo 5' una secuencia *leader*, de 99 nucleótidos en el caso del TGEV, que también se encuentra en el extremo 5' del gRNA. Esta secuencia se incorpora a los sgmRNAs mediante un proceso de transcripción discontinua dirigido por las secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs) formadas por un hexanucleótido central conservado (CS), que se repite también en el extremo 3' del *leader*, flanqueado por secuencias de longitud variable denominadas 5' y 3' TRS (Fig. 3) (Zuñiga y col., 2004; Sola y col., 2005; Enjuanes y col., 2006; Sawicki y col., 2007). El proceso de transcripción se inicia copiando el extremo 3' del genoma hasta alcanzar las TRSs localizadas en el extremo 5' de cada gen (TRS-B), que actuarían como señales de parada para la polimerasa viral. En este punto, se produce un cambio de molde, con la hibridación de la secuencia complementaria a la TRS-B (cTRS-B) de la cadena negativa naciente con la TRS del *leader* (TRS-L), de modo que se copia la secuencia del *leader*, generándose los sgRNAs de polaridad negativa (Fig. 3). Éstos actúan de molde para la síntesis de los sgmRNAs de polaridad positiva (Enjuanes y col., 2007). El proceso de cambio de molde está controlado por varios factores, como la complementariedad entre la TRS-L y la cTRS-B o interacciones RNA-RNA que permiten la aproximación en el espacio de regiones distales del genoma (Mateos-Gomez y col., 2011; Sola y col., 2011; Mateos-Gomez y col., 2013).

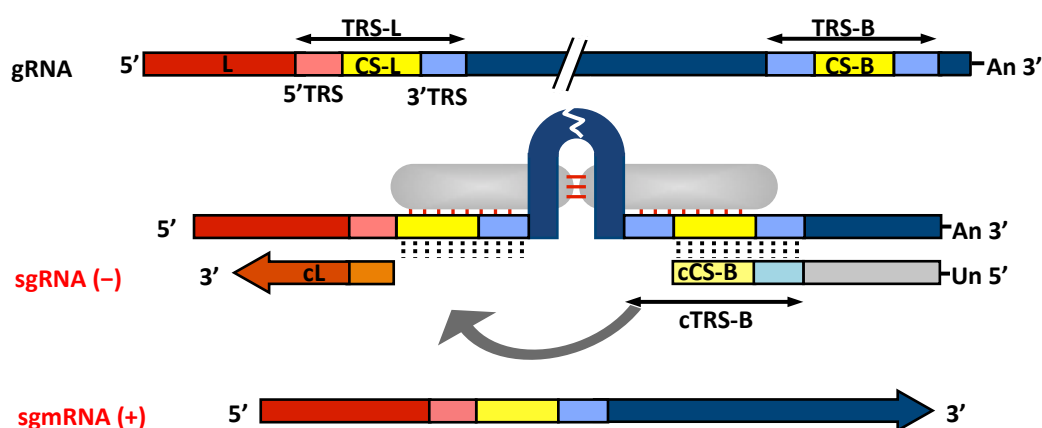


Figura 3. Modelo de transcripción en CoVs. El RNA genómico codificante de polaridad positiva (gRNA) se muestra como una línea azul, en la que se indican la secuencia *leader* (L, rojo) y las TRS del *leader* (TRS-L) y de

los genes (TRS-B), destacando en cada caso la secuencia central conservada (CS-L y CS-B, en amarillo). El RNA de polaridad negativa se representa como una línea gris, donde se indican la secuencia complementaria al *leader* (cL, naranja oscuro) y las secuencia complementaria a la TRS de los genes (cTRS-B), destacándose la secuencia complementaria a la CS de los genes (cCS-B). Interacciones RNA-RNA y RNA-proteína (representadas por el plegamiento del gRNA, y óvalos grises, respectivamente) controlan el cambio de molde (flecha gris).

1.5. Ciclo infectivo

El ciclo infectivo de los CoVs (Fig. 4) comienza con la unión de la proteína S de la superficie del virión al receptor celular, que en el caso del TGEV es la aminopeptidasa N porcina (pAPN) (Delmas y col., 1992), lo que desencadena la endocitosis del virus. Posteriormente, la membrana viral se fusiona con la membrana del endosoma, y se produce el desensamblaje del virión y la liberación del genoma viral al citoplasma, donde es traducido dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab (Lai y Cavanagh, 1997; Perlman y Netland, 2009). Éstas se autoprocenan por proteasas virales, generando 16 nsps que, junto con la proteína N y proteínas celulares, forman el complejo de replicación-transcripción (RTC). Este RTC se ensambla en vesículas de doble membrana (DMVs) originadas a partir del retículo endoplasmático celular (ER) (Knoops y col., 2008). Este complejo lleva a cabo la replicación del genoma viral y la transcripción de los sgRNAs (Sawicki y Sawicki, 1990; Enjuanes y col., 2006; Pasternak y col., 2006; Sawicki y col., 2007; Smith y col., 2014). A partir de los sgRNAs se traducen las proteínas virales estructurales y accesorias. Las proteínas S, M y E se integran en la membrana del ER y se translocan a las cisternas del compartimento intermedio (ERGIC) (Tooze y col., 1984; Stertz y col., 2007). Paralelamente, la proteína N se asocia con los nuevos genomas progenie formando las nucleocápsidas helicoidales. Éstas se incorporan en las partículas virales a través de la interacción entre la proteína N y el dominio C-terminal de la proteína M, que conduce a la invaginación de la membrana del ERGIC alrededor de las nucleocápsidas, dando lugar a los viriones inmaduros (Sturman y col., 1980; Narayanan y Makino, 2001). Los viriones progenie son transportados por las cisternas del aparato de Golgi, produciéndose su maduración conforme progresan a través de la ruta secretora (Salanueva y col., 1999). Finalmente, la progenie viral se libera al medio extracelular mediante la fusión con la membrana plasmática de las vesículas que contienen los viriones (Tooze y col., 1987).

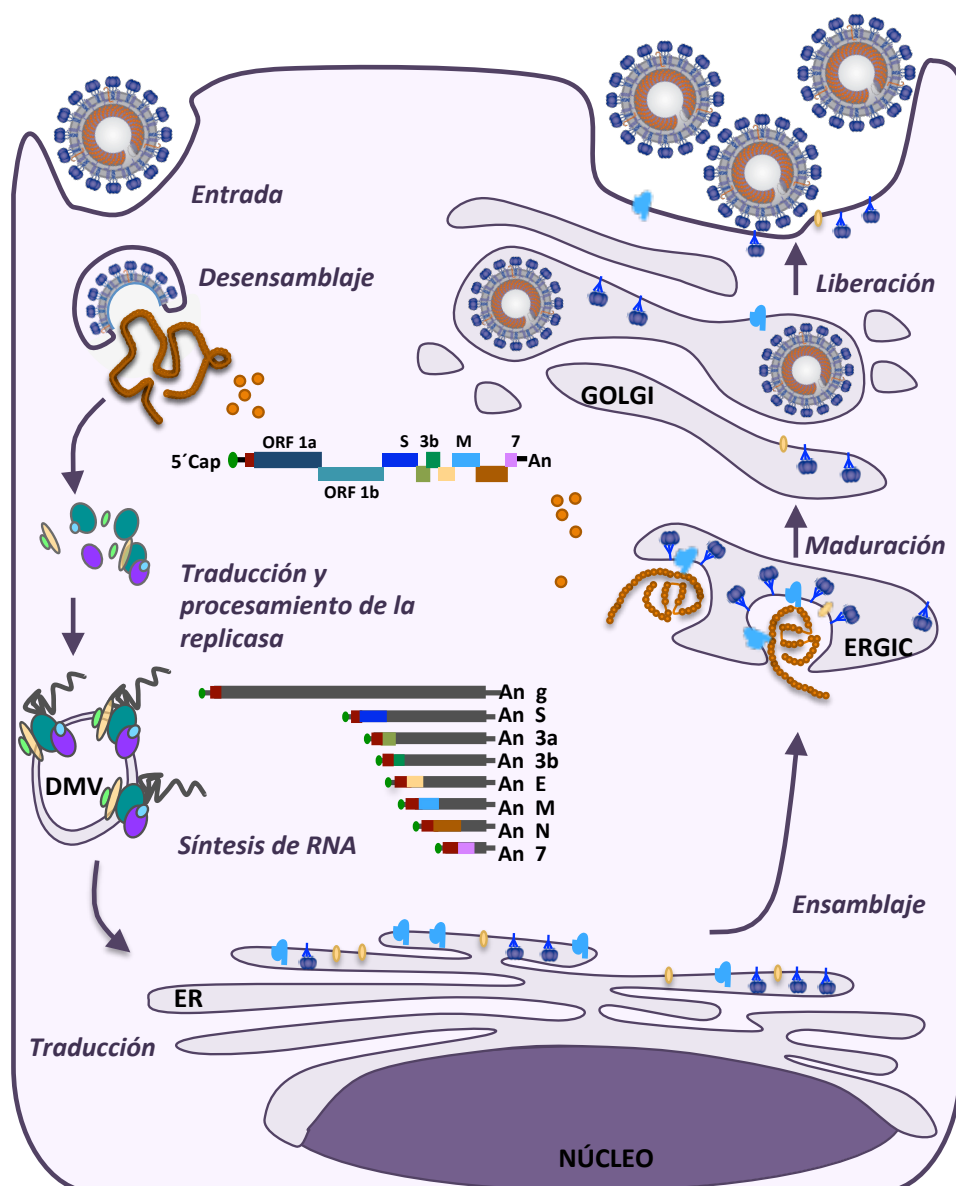


Figura 4. Ciclo infeccioso de CoVs. Esquema de la infección por el TGEV en el que se muestran las diferentes fases del ciclo infeccioso. Sólo se representan las especies de RNA codificantes, de polaridad positiva. An, poliA; DMV, vesícula de doble membrana; ER, retículo endoplasmático; ERGIC, compartimento intermedio; GOLGI, aparato de Golgi.

2. EL COMPLEJO DE REPLICACIÓN-TRANSCRIPCIÓN EN CoVs

La síntesis de RNA en CoVs incluye dos procesos de síntesis de RNA: uno continuo, para la replicación del genoma, y otro discontinuo para la transcripción de los sgRNAs. Ambos procesos son llevados a cabo por el RTC, formado por los productos generados por el procesamiento de las poliproteínas pp1a y pp1ab, resultantes de la transcripción del gen de la replicasa, junto a diversos factores celulares (Sevajol y col., 2014; Sola y col., 2015). De las 16 nsps de CoVs, las proteínas derivadas de la poliproteína pp1a (nsp1 a nsp11) son

comunes con las derivadas de la pp1ab (nsp1 a nsp10 y nsp12 a nsp16), excepto la nsp11, un polipéptido generado cuando no tiene lugar el salto de fase del ribosoma (Fig. 5) (Ziebuhr, 2005; Neuman y col., 2014).

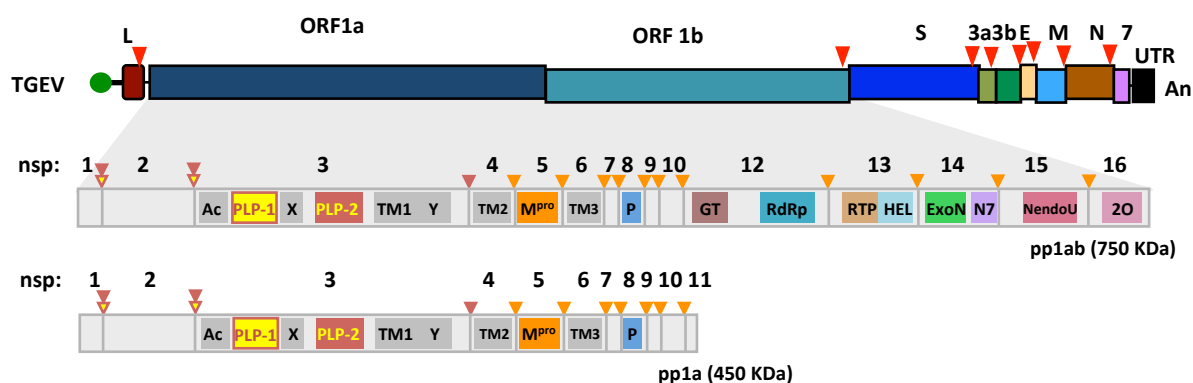


Figura 5. Estructura del genoma del TGEV y de las poliproteínas de la replicasa. En la parte superior se muestra el esquema del genoma del TGEV, incluyendo la estructura 5'cap (verde), la secuencia *leader* (L), los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3a, 3b, E, M, N y 7), la región 3' no traducida (UTR) y el poliA (An). Los triángulos rojos invertidos en la parte superior representan las TRS. En la parte inferior se muestra el esquema de la organización y procesamiento proteolítico de las poliproteínas pp1a y pp1ab del TGEV, con las nsps a las que dan lugar, numeradas del 1 al 11 en el caso de la pp1a, y del 1 al 10 y del 12 al 16 en el caso de la pp1ab. Los sitios de procesamiento por las proteasas virales PLP1, PLP2 y M^{pro} se indican por triángulos invertidos amarillos, rojos y naranjas, respectivamente. Ac, dominio ácido; PLP1 y PLP2, proteasas similares a papaína 1 y 2; X, dominio con actividad adenosina difosfato ribosa fosfatasa (ADRP); Y, dominio que contiene una región transmembrana y un dominio de unión a metales; TM1, TM2 y TM3, dominios transmembrana; M^{pro}, proteasa principal; P, primasa; GT, guanililtransferasa; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; RTP, RNA trifosfatasa; HEL, helicasa; ExoN, exonucleasa; N7, N7-metiltransferasa; NendoU, endoribonucleasa; 2O, 2'-O ribosametiltransferasa.

2.1. Formación del RTC

En CoVs, como en otros virus RNA de polaridad positiva, los procesos de síntesis de RNA se producen asociados a DMVs originadas a partir del ER (Knoops y col., 2008; van Hemert y col., 2008). Las proteínas virales nsp3, nsp4 y nsp6 son proteínas transmembrana que intervienen en la formación de las DMVs y en el anclaje del RTC en estas estructuras membranosas (Oostra y col., 2007; Imbert y col., 2008; Oostra y col., 2008; Gadlage y col., 2010). Además, la nsp3 presenta dos dominios proteasa similares a papaína (PLP1 y PLP2), implicados en el procesamiento proteolítico de la región N-terminal de las poliproteínas (Fig. 5). La nsp5 o proteasa principal (M^{pro}), es responsable de su autoproteólisis y del procesamiento de todas las nsps situadas a partir de su extremo C-terminal (Ziebuhr, 2005; Neuman y col., 2014).

2.2. El núcleo del RTC

Para la síntesis de RNA en virus con genoma RNA se requieren una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, nsp12 en CoVs), y una helicasa (nsp13 en CoVs). Los CoVs codifican además una serie de enzimas de procesamiento de RNA que no están presentes en otros virus RNA, como una exoribonucleasa (ExoN, nsp14) y una endoribonucleasa (NendoU, nsp15), proteínas implicadas en la síntesis del 5'cap como una RNA trifosfatasa (RTPasa, nsp13), una guanililtransferasa (GTasa, nsp12), una N7-metiltransferasa (N7-MTasa, nsp14) y una 2'-O-ribosa-metiltransferasa (2O-MTasa, nsp16) (Gorbalenya y col., 2006; Sevajol y col., 2014). En base a las interacciones entre nsps y a las estructuras tridimensionales descritas, se ha propuesto un modelo según el cual la síntesis de RNA en CoVs requiere la presencia de un complejo multiproteico que contiene la RdRp y, al menos, otras 5 nsps (Fig. 6) (Smith y Denison, 2013; Subissi y col., 2014a). Este complejo constituye el núcleo del RTC y posee actividad polimerasa con procesividad y corrección de errores (Subissi y col., 2014a).

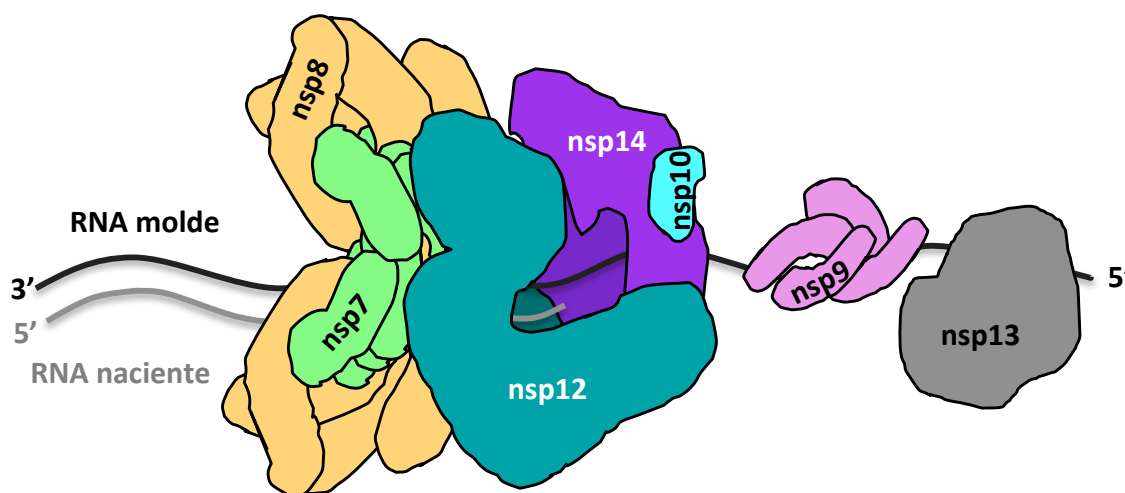


Figura 6. Complejo de replicación-transcripción en CoVs. Modelo para el complejo proteico que forma el RTC en CoVs. Se indica el RNA molde de polaridad positiva (negro) y el RNA naciente de polaridad negativa (gris). La proteína nsp13 (helicasa) desenrolla el RNA sintetizado, y la proteína nsp9 protege el RNA de cadena sencilla. La proteína nsp12 (RdRp) y las proteínas nsp14-nsp10 (ExoN) aportan actividad polimerasa y correctora de errores, y las nsp7 y nsp8 forman un factor de procesividad hexadecamérica. Figura adaptada de Smith y Denison, 2013.

La proteína nsp12, con más de 900 aminoácidos, presenta dos dominios funcionales: el N-terminal, con actividad nucleotidil-transferasa (NiRNA) (Lehmann y col., 2015), y el C-terminal, con actividad polimerasa. En este dominio se han identificado los subdominios de

dedos, palma y pulgar característicos de las polimerasas, por homología con otras RdRps (Xu y col., 2003). Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína nsp12 posee actividad RdRp dependiente de cebador y presenta una baja procesividad, incompatible con la síntesis del largo genoma de los CoVs (Cheng y col., 2005; te Velthuis y col., 2010). Sin embargo, en el contexto del RTC, la RdRp interacciona con un complejo hexadecamérico formado por las proteínas nsp7 y nsp8. Este complejo tiene propiedades estructurales características de un factor de procesividad, actividad que recientemente se ha demostrado tras la reconstitución del complejo *in vitro* (Zhai y col., 2005; Subissi y col., 2014b). Además, la proteína nsp8 presenta actividad RdRp independiente de cebador, y se ha propuesto que actúa como primasa en la síntesis de los cebadores necesarios para la síntesis de RNA mediada por la proteína nsp12 (Imbert y col., 2006; Sevajol y col., 2014). El núcleo del RTC se completa con las proteínas nsp14 y nsp10 que confieren actividad correctora de errores (ver apartado 2.2.1.).

Además del núcleo del RTC, se ha propuesto que dos nsps adicionales tendrían un papel fundamental durante la síntesis del RNA de CoVs (Fig. 6). La proteína nsp9 es una proteína de unión a RNA de cadena sencilla (ssRNA), sin especificidad de secuencia, que forma dímeros, e interacciona con la proteína nsp8 (Egloff y col., 2004; Sutton y col., 2004; Miknis y col., 2009). Atendiendo a sus propiedades estructurales y funcionales se ha propuesto que la proteína nsp9 tiene la función de proteger los RNAs virales durante su síntesis (Sevajol y col., 2014).

Otra proteína que se une al núcleo del RTC es la proteína nsp13, que actúa como helicasa. La proteína nsp13 contiene un dominio helicasa del tipo SF1 y un dominio de unión a zinc, crítico para la actividad helicasa *in vitro* (Ivanov y col., 2004; Seybert y col., 2005). Estudios bioquímicos han demostrado que esta proteína actúa sobre sustratos dsRNA y DNA de cadena doble (dsDNA) en la dirección 5'-3', y presenta actividad NTPasa y dNTPasa, por la que obtiene la energía requerida llevar a cabo el desplegamiento del sustrato (Adedeji y col., 2012). La actividad helicasa de la proteína nsp13 se ve incrementada *in vitro* por la interacción directa con la proteína nsp12, lo que sugeriría que esta interacción está presente en el RTC (Adedeji y col., 2012). Sin embargo, la actividad helicasa 5'-3' de la proteína nsp13 no se ajusta a la polaridad 3'-5' requerida durante la síntesis del RNA de CoVs (Ziebuhr, 2005). Por ello, se ha propuesto que helicasas celulares podrían llevar a cabo esta función.

En este sentido, las helicasas celulares DDX5 y DDX1 se han involucrado en la síntesis de RNA de CoVs (Sola y col., 2015).

2.2.1. La proteína nsp14. Sistema de corrección de errores en CoVs

La proteína nsp14 forma parte del núcleo del RTC e interacciona con la RdRp. Ésta es una proteína bifuncional con actividad ExoN en su dominio N-terminal y N7-MTasa en su dominio C-terminal (Chen y col., 2013; Smith y Denison, 2013; Ma y col., 2015). La ExoN de los CoVs pertenece a la superfamilia de exonucleasas DEDD (Snijder y col., 2003). Esta familia, cuyo nombre deriva de los aminoácidos presentes en el centro activo, incluye DNasas y DNA polimerasas con actividad correctora de errores (*proofreading*) por lo que se postuló que la actividad ExoN podría formar parte de un sistema de *proofreading* identificado por primera vez en el mundo de los virus RNA (Snijder y col., 2003). Este sistema se relacionó con la baja tasa de mutación en CoVs (2.5×10^{-6} mutaciones por nucleótido y ciclo de replicación), por debajo del rango de característico de otros virus de RNA, cuyas tasas de mutación oscilan de 10^{-3} a 10^{-5} mutaciones por nucleótido y ciclo de replicación (Drake y Holland, 1999; Eckerle y col., 2007; Denison y col., 2011). Además, el hecho de que sólo los nidovirus con un genoma mayor de 20 Kbp (lo que incluye *Coronavirus*, *Ronivirus* y *Mesonivirus*) codifican esta actividad en su genoma, y los *Arterivirus*, con un genoma de 13-15 Kbp no la presentan, sugería que la presencia de esta enzima era necesaria para la expansión del genoma viral (Gorbalenya y col., 2006; Smith y Denison, 2012; Lauber y col., 2013). La actividad ExoN de la proteína nsp14 se demostró y caracterizó *in vitro*, observándose que esta proteína hidroliza ssRNA y dsRNA en sentido 3'-5' sin especificidad de secuencia, generando productos de 8-12 ó 5-7 nucleótidos, respectivamente (Minskaia y col., 2006). La actividad máxima se demostró en sustratos de dsRNA o estructuras con un nucleótido desapareado en el extremo 3', equivalentes a las generadas por la incorporación errónea de un nucleótido durante la síntesis de RNA (Bouvet y col., 2012). Finalmente, otro aspecto a favor de la existencia de un sistema de *proofreading* en CoV, fue la obtención de virus mutantes en los aminoácidos DEDD del centro activo de la enzima. Sustituciones de estos aminoácidos que eliminan *in vitro* la actividad ExoN producen virus con un fenotipo mutador, en el MHV y el SARS-CoV, con un incremento de 15 a 20 veces en la tasa de error de replicación (Eckerle y col., 2007; Eckerle y col., 2010). Además, a diferencia de los virus con actividad ExoN, estos mutantes son sensibles al mutágeno 5-fluorouracilo que provoca un incremento en las tasas de

mutación de los CoVs mutantes y lleva a la extinción viral por mutagénesis letal (Smith y col., 2013).

La actividad *in vitro* de la proteína nsp14 se incrementa 35 veces por su interacción con la proteína nsp10, que se une a la proteína nsp14 y forma parte del núcleo del RTC (Bouvet y col., 2012). Esta proteína, sin actividad enzimática, presenta en su estructura dos dedos de zinc (ZFs), y une dsRNA y dsDNA *in vitro* con gran afinidad y sin especificidad de secuencia (Joseph y col., 2006; Matthes y col., 2006; Ma y col., 2015). Recientemente se han obtenido mutantes de esta proteína que presentan una disminución en la fidelidad de replicación, reforzando la conclusión de que la proteína nsp10 regula la actividad ExoN de la proteína nsp14 (Smith y col., 2015).

2.3. Otras proteínas de la replicasa

Las proteínas nsp1 y nsp2 están poco conservadas en CoV y se desconoce su función en la síntesis de RNA. De hecho, los CoV de los géneros γ y δ no codifican la nsp1 (Ziebuhr, 2005; Neuman y col., 2014). La proteína nsp2 es reclutada a los sitios de síntesis del RNA viral, y su eliminación o delección produce una disminución del 50% en la síntesis del RNA viral y en el título viral (Graham y col., 2005; Hagemeijer y col., 2010).

La proteína nsp15 posee actividad endorribonucleasa (NendoU), y aparece de forma única en los *Nidovirus* que infectan vertebrados (Nga y col., 2011). Esta proteína colocaliza parcialmente con el RTC, aunque su función en la síntesis de RNA viral se desconoce (Neuman y col., 2014). Estudios bioquímicos han demostrado que la nsp15 forma hexámeros e hidroliza ssRNA y dsRNA, preferiblemente en posición 3' de residuos de uridina, produciendo moléculas con 2'-3'-fosfato cíclico en el extremo, por un mecanismo similar al de la RNasa A (Bhardwaj y col., 2004; Bhardwaj y col., 2006; Subissi y col., 2014a).

2.4. Síntesis del 5'cap en CoVs

Los mRNAs eucariotas se caracterizan por presentar una molécula de N7-metilguanosina unida al extremo 5' del primer nucleótido mediante un enlace 5'-5' trifosfato. Esta estructura, conocida como *cap-0*, desempeña importantes funciones biológicas, como la unión al factor de inicio de traducción 4E, el cual media la unión del ribosoma permitiendo la traducción, la protección de los mRNAs frente a degradación por 5'-3' exorribonucleasas, y la exportación de los mRNAs al citoplasma (Decroly y col., 2012). En eucariotas superiores la

ribosa del primer nucleótido de la cadena es metilada en posición 2' para dar la estructura *cap-1*, evitando el reconocimiento de los mRNAs por sensores citoplasmáticos que desencadenan la respuesta antiviral (Zust y col., 2011). Los virus que infectan eucariotas y replican en el citoplasma no tienen acceso al complejo enzimático que media la síntesis del 5'-*cap* de los mRNAs celulares, por lo que han desarrollado mecanismos para incorporarlo a sus mRNAs (Decroly y col., 2012). En CoVs, las enzimas implicadas en la síntesis del 5'-*cap* están codificadas en la ORF1b, de forma que muchas de las enzimas del RTC presentan, además de actividades propias de la síntesis de RNA, actividades implicadas en el proceso de síntesis 5'-*cap* (Fig. 7).

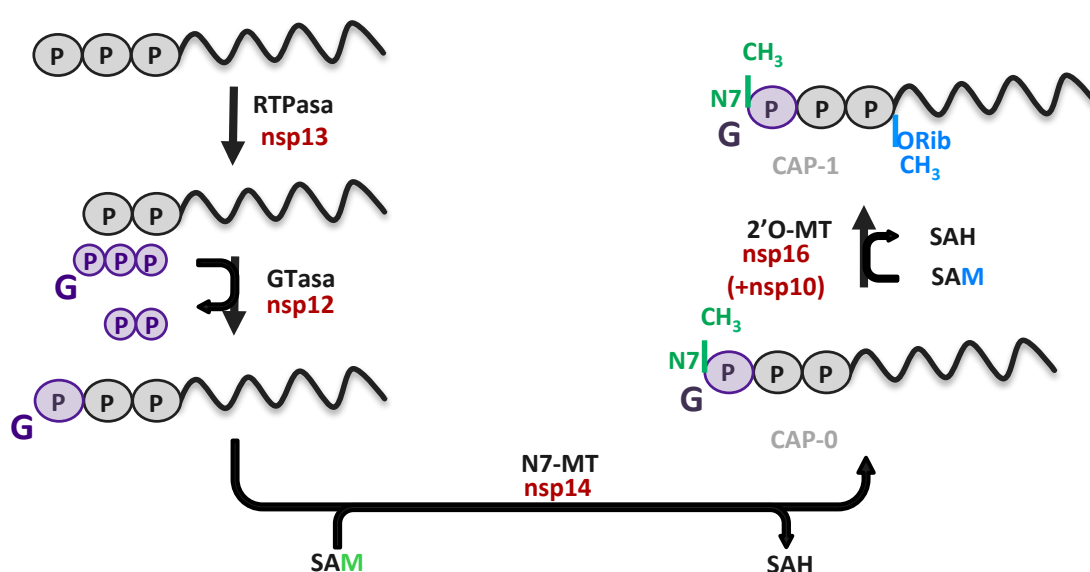


Figura 7. Ruta de síntesis del 5'-*cap* en CoVs. Esquema de la ruta para añadir el 5'-*cap* a los RNAs de CoV. La nsp que codifica cada actividad enzimática de la ruta se indica en rojo. RTPasa, RNA trifosfatasa; GTasa, guanililtransferasa; N7-MT, N7-metiltransferasa; 2'O-MT, 2'-O-ribosametiltransferasa. SAM, S-adenosil-L-metionina; SAH, S-adenosil-L-homocisteína.

La síntesis del 5'-*cap* en CoVs se lleva a cabo por la vía canónica, que consiste en una serie de 4 reacciones: (1) hidrólisis del fosfato en posición gamma del primer nucleótido del mRNA por una RTPasa, (2) transferencia de una molécula de guanosina monofosfato (GMP) al mRNA 5'-difosfato, por una guanililtransferasa (GTasa), (3) adición de un grupo metilo en la posición N7 de la guanosina a partir del cofactor S-adenosil-L- metionina (SAM), por una N7-metiltransferasa (N7-MTasa) para formar el *cap-0*, y (4) 2'-O-metilación del *cap-0* por una 2'-O-ribosametiltransferasa (2'O-MTasa), a partir de una molécula de SAM para formar el *cap-1* (Fig. 7). En CoVs, las actividades RTPasa, GTasa, N7-MTasa y 2'-O-MTasa se han demostrado

in vitro en las enzimas nsp13 (Ivanov y Ziebuhr, 2004), nsp12 (Lehmann y col., 2015), nsp14 (Chen y col., 2009; Chen y col., 2013) y nsp16 (Decroly y col., 2008), respectivamente. Además, el complejo de metilación se ha reconstituido *in vitro* (Bouvet y col., 2010). La reacción de 2'-O-metilación requiere la unión directa de la proteína nsp10 a la proteína nsp16, mientras que la N7-metilación es llevada a cabo por la enzima nsp14 sin requerimiento de la proteína nsp10. Cabe destacar, como se ha mencionado en el apartado anterior, que la proteína nsp10 estimula la actividad ExoN de la proteína nsp14. Es más, la proteína nsp10 presenta una superficie de interacción común con las proteínas nsp14 y nsp16 (Lugari y col., 2010; Ma y col., 2015). Por ello, se ha propuesto que la proteína no enzimática nsp10 actúa como moduladora de dos procesos diferentes, el *proofreading*, y la síntesis del 5'-*cap* (Bouvet y col., 2014).

3. VECTORES VIRALES

El desarrollo de sistemas de genética reversa y el avance en el conocimiento de la biología viral, que permiten el diseño de estrategias de atenuación racionales, han posibilitado el desarrollo de vectores virales para su uso en la obtención de vacunas. A pesar de la escasez de vacunas basadas en vectores virales en la práctica clínica actual, numerosos ensayos en desarrollo utilizan vectores virales para su uso en salud humana o animal. La principal ventaja de los vectores virales es su eficacia para inducir una respuesta inmune fuerte en el hospedador. Existe una amplia variedad de virus utilizados como vectores, incluyendo virus DNA (entre los que desatacan adenovirus, poxvirus, parvovirus y herpesvirus), retrovirus, y virus RNA de polaridad negativa y positiva (Draper y Heeney, 2010). Entre los vectores virales basados en virus ssRNA de polaridad positiva destacan varios *Alfavirus* como el virus Sindbis, el virus del bosque de Semliki (SFV) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), que tienen una gran capacidad de clonaje y altos niveles de expresión de proteínas heterólogas. Los vectores basados en *Flavivirus* también han alcanzado un importante desarrollo. De hecho, una vacuna basada en un vector atenuado del virus de la fiebre amarilla (YFV-17D) que expresa proteínas del virus de la encefalitis japonesa (JEV) ha sido recientemente aprobada para su uso en humanos (Mogler y Kamrud, 2015).

La estabilidad genética de los vectores de expresión virales es un factor esencial para su uso en el desarrollo de vacunas. En general, la estabilidad de los vectores basados en virus DNA y RNA de polaridad negativa es alta, dado que presentan bajos niveles de

recombinación que permiten el mantenimiento de los genes heterólogos (Bukreyev y col., 2006). En cambio, los virus con genoma RNA de polaridad positiva presentan una alta frecuencia de recombinación, tanto homóloga como no homóloga, que favorece la pérdida de los genes heterólogos impidiendo su expresión a largo plazo (Figlerowicz y col., 2003; Alejska y col., 2005).

3.1 . Vectores basados en genomas de CoVs

Los CoVs poseen varias ventajas frente a otros sistemas virales de expresión. En primer lugar, y como otros virus ssRNA que replican en el citoplasma sin intermediarios de DNA, su integración en el genoma del huésped es improbable (Lai y Cavanagh, 1997). Además, por el gran tamaño de su genoma, en principio aceptarían la inserción de genes heterólogos de gran tamaño (Masters, 1999; Enjuanes y col., 2005), y por su mecanismo de expresión génica pueden diseñarse módulos de expresión multicistónica (Enjuanes y col., 2001; Thiel y col., 2003b; Cruz y col., 2010). Los CoVs presentan los antígenos en las mucosas lo que promueve inmunidad sistémica y secretora, incluyendo inmunidad lactogénica (Enjuanes y Van der Zeijst, 1995; Saif, 1996; Sola y col., 2003). Además, se conocen las bases moleculares del tropismo de CoVs y, en el caso del TGEV, se dispone de una colección de vectores que replican con títulos altos tanto en el tracto entérico como en el respiratorio del cerdo, que inducen una buena respuesta inmune tanto humoral como celular (Sanchez y col., 1999; Casais y col., 2003). Por último, se dispone de cepas atenuadas de CoVs que infectan la mayoría de las especies de interés en el desarrollo de vacunas (humana, porcina, bovina, felina y aviar), disponibles para el desarrollo de vectores bioseguros (Ortego y col., 2002; Cavanagh y col., 2007). El desarrollo de sistemas de genética reversa eficientes hace posible la manipulación eficaz del genoma de los CoVs, y existen sistemas de genética reversa disponibles para numerosas especies de CoVs (Almazan y col., 2000; Casais y col., 2001; Thiel y col., 2001; Yount y col., 2002; Yount y col., 2003; Almazan y col., 2006; Almazan y col., 2013).

3.1.1. *Sistemas de genética reversa en CoV*

Durante mucho tiempo, la generación de clones infectivos de CoVs estuvo limitada por el gran tamaño de su genoma y la existencia de regiones tóxicas en los genes de la replicasa, que impedían el clonaje y crecimiento en bacterias. Por ello, inicialmente los estudios de

expresión génica se limitaban al uso de RNAs defectivos o minigenomas que requieren un virus complementador para replicar (Enjuanes y col., 2005; Almazan y col., 2014).

El primer cDNA infectivo derivado de CoVs se construyó en nuestro laboratorio para el TGEV y se ensambló en un cromosoma artificial de bacteria (BAC) (Almazan y col., 2000). Este tipo de plásmidos permite el clonaje de secuencias de hasta 300 Kbp y, debido a su bajo número de copias por célula (1 ó 2), permite reducir la toxicidad del cDNA viral durante su propagación en *Escherichia coli*. El cDNA de TGEV se clonó bajo el promotor de citomegalovirus (CMV), y en el extremo 3' se incluyeron una secuencia de poliadenina, la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta, y la señal de poliadenilación y terminación de la hormona de crecimiento bovina para la generación de extremos 3' del RNA correctos (Almazan y col., 2000). Cuando el cDNA infectivo se transfecta en la célula eucariota, el RNA viral se transcribe en el núcleo por la RNA polimerasa II celular, y posteriormente se transloca al citoplasma iniciándose el ciclo infectivo del virus (Almazan y col., 2014). Esta estrategia también se ha empleado para desarrollar clones infectivos para el SARS-CoV, el HCoV-OC43, el FIPV y recientemente el MERS-CoV (Almazan y col., 2006; St-Jean y col., 2006; Balint y col., 2012; Almazan y col., 2013). Existen otras estrategias para la generación de clones infectivos de CoVs basadas en la ligación *in vitro* de cDNAs que codifican el genoma viral completo bajo el control del promotor del fago T7, o en la propagación del cDNA infectivo utilizando el virus vaccinia (Yount y col., 2000; Thiel y Siddell, 2005). Estos métodos permiten la generación de RNAs infectivos que se electroporan en células susceptibles a la infección viral. Este sistema se ha utilizado para la construcción de clones infectivos de los virus TGEV, HCoV-229E, MHV, IBV, SARS-CoV, HCoV-NL63, FIPV y MERS-CoV (Casais y col., 2001; Thiel y col., 2001; Yount y col., 2002; Coley y col., 2005; Yount y col., 2005; Yount y col., 2005; Donaldson y col., 2008; Tekes y col., 2012; van den Worm y col., 2012; Scobey y col., 2013).

3.1.2. Expresión de proteínas heterólogas por CoVs

La expresión de proteínas heterólogas se ha estudiado con CoVs de los géneros α , β y γ , utilizando genes marcadores como el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) o el de la luciferasa (Sarma y col., 2002; de Haan y col., 2003; Sola y col., 2003; de Haan y col., 2005; Shen y col., 2009; Bentley y col., 2013). Además, utilizando vectores derivados del TGEV se han expresado proteínas del PRRSV (Cruz y col., 2010), y se ha conseguido la formación de

partículas similares a virus (VLPs) mediante la expresión bicistónica de las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus (Ribes y col., 2011). Se han estimado niveles de producción de las proteínas heterólogas de hasta 40 $\mu\text{g}/10^6$ células (Sola y col., 2003). Sin embargo, estos vectores presentan el inconveniente de tener una limitada estabilidad, caracterizada por la pérdida de los genes heterólogos, lo que impide la expresión de la proteína heteróloga durante periodos prolongados *in vitro* (Sola y col., 2003; de Haan y col., 2005; Shen y col., 2009; Cruz y col., 2010; Bentley y col., 2013) e *in vivo* (Bentley y col., 2013).

La estabilidad de los vectores depende de las propiedades intrínsecas de la proteína expresada, así como del *locus* en el que se insertan los genes heterólogos en el genoma de CoV. En general, la estabilidad es mayor cuando los genes heterólogos se insertan reemplazando genes no esenciales de CoV (de Haan y col., 2003; Sola y col., 2003; de Haan y Rottier, 2005; Bentley y col., 2013). En el caso de los vectores derivados del TGEV, estudios de nuestro laboratorio determinaron que el *locus* óptimo para la expresión estable de genes heterólogos era reemplazando los genes no esenciales 3a y 3b (Sola y col., 2003). Por ello, en todos los vectores generados durante esta tesis los módulos de expresión heterólogos se clonaron en dicha posición genómica.

3.2. Tropismo de CoVs

La obtención de vectores derivados del TGEV con tropismo respiratorio y entérico permite la estimulación de los tejidos linfoides asociados al tubo digestivo, con relevancia para la inducción de la respuesta inmune secretora (Chattha y col., 2015).

El tropismo de CoVs está determinado fundamentalmente por la proteína S. Esta proteína contiene el sitio de unión al receptor y, en algunos CoV, además un sitio de unión a carbohidratos que también influye en el tropismo de tejido (Gallagher y Buchmeier, 2001). En el caso del TGEV, se ha identificado una región en el dominio N-terminal que media la unión a ácido siálico y es determinante para la enteropatogenicidad del virus (Sanchez y col., 1999; Schwegmann-Wessels y col., 2002). Las cepas silvestres del TGEV presentan tropismo respiratorio y entérico. Sin embargo, estas cepas son inestables en cultivos celulares, generándose mutantes atenuados con tropismo exclusivamente respiratorio, similares al aislado del TGEV tipo Purdue (PTV) (Sanchez y col., 1999). En el laboratorio se dispone de una colección de mutantes del TGEV en el gen S que permitió identificar los aminoácidos responsables del cambio de tropismo. De este modo, se generaron virus mutantes en la

proteína S, estables en cultivos celulares, que presentaban tropismo respiratorio y entérico *in vivo* (C.M. Sanchez, M. Becares, S. Zuñiga y L. Enjuanes, manuscrito en preparación). Todos los vectores generados en esta tesis se basan en uno de estos mutantes del gen S, llamado S_{7.1}, que alcanza altos títulos en cultivos celulares y mantiene el tropismo entérico.

3.3. Atenuación de CoVs

Históricamente la atenuación de los virus se conseguía mediante pases seriados en cultivos celulares (Draper y Heeney, 2010). El conocimiento de las bases moleculares de la virulencia permite diseñar estrategias de atenuación racionales. En el caso de los CoVs se han aplicado diversas estrategias para su atenuación. En primer lugar, los cambios de tropismo producen fenotipos atenuados (Gallagher y Buchmeier, 2001). Este es el caso del TGEV, para el que el tropismo entérico determina la patogénesis, mientras que el tropismo exclusivamente respiratorio resulta en mutantes atenuados, a pesar de que replican con altos títulos *in vivo* (Sanchez y col., 1999). Además, se han identificado diversos factores de virulencia en CoVs, cuya mutación o eliminación conduce a la generación de fenotipos atenuados. En el caso del FIPV, la delección de los genes no esenciales 3a y 3b resultaba en mutantes viables con un fenotipo atenuado (Haijema y col., 2004), si bien este efecto no era trasladable a otros CoVs como el TGEV (Sola y col., 2003). La eliminación de regiones de las proteínas nsp1 o nsp2 también produjo fenotipos atenuados en el MHV y el SARS-CoV (Brockway y Denison, 2005; Graham y col., 2005; Wathelet y col., 2007).

Otras estrategias de atenuación empleadas han sido, en el caso del MHV, la alteración del orden de los genes (de Haan y col., 2002) o, en el TGEV, la duplicación de secuencias génicas para evitar el solapamiento de genes existente de forma natural en CoVs (Ortego y col., 2003). Además, como se ha expuesto previamente (apartado 1.3.), se pueden generar CoVs competentes en replicación y deficientes en propagación, que pueden ser crecidos en células empaquetadoras, lo que permite incrementar su bioseguridad (Ortego y col., 2002).

4. EL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO (PRRS)

4.1. Historia y características de la enfermedad

El PRRS fue descrito por primera vez en 1987 en Carolina del Norte, EE.UU., donde se denominó “Enfermedad misteriosa del cerdo” (Zimmerman, 2003). El agente causal de la enfermedad se aisló por primera vez en 1991 en Lelystad (Holanda) a partir de cultivos de

macrófagos alveolares porcinos (Wensvoort y col., 1991). Desde la aparición de los primeros brotes, la enfermedad se ha extendido muy rápidamente siendo hoy día una enfermedad endémica en la gran mayoría de los países productores de ganado porcino. Además, han surgido cepas altamente patógenas en Asia y Europa del este (Tong y col., 2007; Karniychuk y col., 2010; Rowland y Morrison, 2012). En la actualidad el PRRS se considera la enfermedad infecciosa más importante de la cabaña porcina a nivel mundial, provocando pérdidas anuales de más de 1000 millones de dólares en EE.UU. (Holtkamp y col., 2012).

La enfermedad del PRRS es sistémica y se caracteriza por causar fallo reproductivo en cerdas gestantes y fallo respiratorio en lechones, si bien la morbilidad y letalidad asociadas a la infección por el PRRSV son muy variables (Le Potier y col., 1997; Nodelijk, 2002). En el primer caso, cuando se produce la infección de una cerda gestante, el virus puede atravesar la barrera placentaria e infectar los fetos, provocando partos prematuros, así como el nacimiento de una combinación de lechones vivos (normalmente virémicos con una baja viabilidad) y momificados (Karniychuk y col., 2010). En el caso de la infección de lechones, se produce una enfermedad respiratoria con aparición de neumonía intersticial, normalmente complicada por lesiones causadas por infecciones bacterianas concurrentes que se favorecen por la inmunosupresión causada por la infección por el PRRSV. El cuadro clínico se caracteriza por apatía, anorexia, disnea y cianosis, y la ganancia de peso media diaria disminuye en un 25-50% (Le Potier y col., 1997; Rossow, 1998).

4.2. El PRRSV

El PRRSV pertenece al género *Arterivirus*, de la familia *Arteriviridae*, que se incluye, como los CoVs, en el orden *Nidovirales* (Fig. 1). El PRRSV es un virus con envuelta y genoma RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, con un tamaño de 14.5 Kbp (Meulenberg, 2000; Snijder y col., 2005). De forma análoga a los CoVs, su genoma incluye las ORFs 1a y 1b, que codifican un conjunto de 12 nsps, y las ORFs 2 a 7, que codifican las glicoproteínas estructurales GP2a (ORF2a), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4), GP5 (ORF5), GP5a (ORF5a), la proteína de la envuelta (E, ORF2b), la proteína de membrana (M, ORF6) y la proteína de la nucleocápsida (N, ORF7) (Firth y col., 2011; Johnson y col., 2011; Kappes y Faaberg, 2015). El virión, esférico, con un tamaño de entre 48 y 83 nm está compuesto por una nucleocápsida icosaédrica formada por la proteína N y una envuelta lipídica en la que se insertan las proteínas de membrana. Entre éstas se encuentran las proteínas mayoritarias de la envuelta GP5 y M. En el virión estas dos

proteínas forman un heterodímero que se ha implicado en la unión con el receptor celular del virus (Van Breedam y col., 2010). En la membrana se insertan también las glicoproteínas minoritarias, GP2a, GP3 y GP4, que se asocian formando heterotrímeros que interaccionan con el heterodímero GP5-M y también con la proteína E. La interacción de este heterotrímero con la proteína CD163 se ha relacionado con el proceso de desensamblaje (Welch y Calvert, 2010; Delputte y col., 2011).

El PRRSV presenta un fuerte tropismo por células de la línea monocito-macrófago, concretamente macrófagos alveolares y macrófagos intravasculares del pulmón, donde se produce la replicación primaria del virus, después de la cual se disemina a los tejidos linfoides próximos y finalmente se origina una infección sistémica (Oleksiewicz y Nielsen, 1999). El estado de viremia se inicia 12 horas después de la infección (hpi) y es prolongado, detectándose hasta 2-4 semanas post-infección en animales adultos y hasta 3 meses post-infección en lechones, pudiendo originar infecciones persistentes (Chand y col., 2012).

Se diferencian dos genotipos, el genotipo 1 o europeo y el genotipo 2, prevalente en América y Asia. A pesar de que ambos producen signos clínicos similares, existe una importante variabilidad genética incluso dentro de un mismo genotipo. En el caso de la proteína GP5, la más variable, la diferencia en la secuencia de aminoácidos puede ser hasta del 50%.

4.3. Respuesta inmune y protección frente al PRRSV

La larga duración de la infección por el PRRSV se ha relacionado con la inducción de una respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, débil y de aparición tardía después de la infección (Kimman y col., 2009; Lunney y col., 2010). La respuesta inmune innata, primera línea de defensa frente a la infección y responsable de la inducción de una respuesta adaptativa eficaz, en el caso de la infección por el PRRSV lleva asociada una inducción de interferón (IFN) nula, o muy reducida en comparación con los niveles inducidos por otros virus respiratorios porcinos (Albina y col., 1998; Murtaugh y col., 2002; Kimman y col., 2009). Se han descrito diversas proteínas del PRRSV que antagonizan la ruta del IFN en diferentes niveles, incluyendo las proteínas nsp1, nsp2, nsp4, nsp11 y la proteína N (Wang y Zhang, 2014; Lyoo, 2015). Además, esta débil inducción de la respuesta de IFN es consistente con una débil producción de citoquinas y una escasa activación de las células *natural killer* (NK) (Murtaugh y col., 2002).

La respuesta inmune humoral frente al PRRSV se caracteriza por una rápida inducción de anticuerpos no neutralizantes, principalmente dirigidos hacia la proteína N, que posee los epítomos inmunodominantes del virus (Yoon y col., 1995). También se ha descrito la inducción de anticuerpos no neutralizantes frente a las proteínas nsp2, GP4, GP5 y M. Vinculado a la existencia de anticuerpos no neutralizantes, se ha descrito que la infección por el PRRSV puede estar asociada al fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) (Loving y col., 2015).

Los anticuerpos neutralizantes se producen en una fase tardía de la infección (3-4 semanas), y generalmente con bajo título (Kimman y col., 2009). El principal epítomo inductor de anticuerpos neutralizantes se localiza en el ectodominio de la proteína GP5 (Kim y Yoon, 2008), muy próximo a un epítomo inmunodominante que podría actuar como epítomo señuelo (Ostrowski y col., 2002). Además, la región de la proteína GP5 donde se encuentra el epítomo inductor de anticuerpos neutralizantes está altamente glicosilada, y en cepas del genotipo 2 se ha descrito que los azúcares podrían enmascarar el reconocimiento de este epítomo (Ansari y col., 2006). Las proteínas GP3, GP4 y M también inducen anticuerpos neutralizantes, aunque de menor eficacia que los producidos por la GP5 (de Lima y col., 2006).

La respuesta a la infección por el PRRSV mediada por células T también es débil y de desarrollo lento, con una baja proliferación de células productoras de IFN- γ después de la infección (Meier y col., 2003; Mateu y Diaz, 2008). La proteína M es la proteína del PRRSV que induce en mayor medida la proliferación de células T, seguida de las proteínas GP5, GP3 y GP2a (Bautista y col., 1999). Por otra parte, se han descrito altos niveles de interleuquina (IL) 10 durante la infección (Chareerntantanakul y col., 2006) y se ha propuesto la estimulación de células T reguladoras por cepas del genotipo 2 para explicar el retraso en la inducción de la respuesta inmune por el PRRSV (Silva-Campa y col., 2009; Silva-Campa y col., 2010).

Actualmente se desconoce el papel que juegan la respuesta humoral y la celular en la protección frente al PRRSV (Darwich y col., 2010; Loving y col., 2015). Por una parte, experimentos de protección pasiva demostraron que la presencia en sangre de anticuerpos neutralizantes con un título superior a 8 es suficiente para bloquear la viremia, y cuando el título es superior a 32 es eficaz para bloquear la replicación en amígdalas y ganglios bronquiales en el 50% de los animales, permitiendo el control de la infección (Lopez y col.,

2007). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que frecuencias de células productoras de IFN- γ superiores a 45 por millón de células mononucleares, permiten prevenir la viremia incluso en ausencia de anticuerpos neutralizantes (Zuckermann y col., 2007).

4.4. Vacunas frente al PRRSV

El desconocimiento de los mecanismos que confieren protección frente al PRRSV, junto con la elevada variabilidad genética del virus, dificultan el desarrollo de vacunas eficaces (Kimman y col., 2009). A pesar de ello, se han generado vacunas, tanto inactivadas como atenuadas, cuyo uso está muy extendido aunque su efectividad es parcial (Renukaradhya y col., 2015).

Las vacunas atenuadas se consideran más eficaces que las inactivadas. Sin embargo, al igual que ocurre en la infección natural con el PRRSV, la inducción de las respuestas protectoras celular y humoral es baja y lenta, mientras que se producen altos niveles de anticuerpos no neutralizantes asociados a ADE (Renukaradhya y col., 2015). Además, la respuesta inducida por estas vacunas muestra una gran variabilidad entre animales (Meier y col., 2003). Las vacunas atenuadas presentan otros inconvenientes: el virus vacunal atenuado puede provocar viremia y ser excretado, y por lo tanto transmitirse a cerdos no vacunados; además estos virus vacunales atenuados pueden revertir a virulentos, causando casos clínicos (Botner y col., 1997; Nielsen y col., 2001).

Las vacunas inactivadas presentan ventajas en cuanto a su seguridad, por su incapacidad para diseminarse y revertir a virulentas. Sin embargo, inducen una estimulación de la respuesta inmune más baja y de menor duración que las atenuadas (Zuckermann y col., 2007; Renukaradhya y col., 2015).

Como estrategia para la mejora de las vacunas existentes, se ha planteado la mejora de los coadyuvantes tradicionales, con la administración de citoquinas recombinantes o vectores que incluyen coadyuvantes genéticos (Chareerntantanakul, 2012). Otra estrategia para estimular la respuesta frente al PRRSV es el uso de vectores, bacterianos o virales, que expresen antígenos del PRRSV y combinar las ventajas de las vacunas atenuadas con la bioseguridad de las inactivadas. Entre los primeros, se han utilizado cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis* que expresan las proteínas GP5 y M del PRRSV e inducen protección parcial. En cuanto al uso de vectores virales, se ha estudiado la utilización de varios virus,

como el virus de la pseudorabia, el adenovirus porcino, y vectores basados en poxvirus, sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no han sido del todo satisfactorios (revisado en Cruz y col., 2010).

5. RESPUESTA INMUNE INNATA

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa frente a patógenos. Esta respuesta se produce por el reconocimiento, mediado por receptores específicos, de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) producidos por la infección (Thompson y Locarnini, 2007; Jensen y Thomsen, 2012).

5.1. Respuesta antiviral activada por RNA de doble cadena

El RNA de doble cadena (dsRNA) actúa como PAMP desencadenando la activación de un mecanismo antiviral que conduce a la inhibición de la traducción, la inducción transcripcional de genes antivirales y la muerte celular (Jensen y Thomsen, 2012). El origen del dsRNA en la infección es diverso, apareciendo durante la infección con virus con distinto tipo de genoma. En CoVs, el dsRNA está presente a lo largo del genoma en regiones que forman estructuras secundarias complejas, o es generado como intermediario de la replicación o la transcripción (Sawicki y col., 2001; Brian y Baric, 2005; Sola y col., 2011). El dsRNA induce la respuesta antiviral activando los receptores del tipo gen I inducible por ácido retinoico (RLRs) o el receptor 3 tipo Toll (TLR-3). En menor medida, la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS) y la quinasa dependiente de dsRNA (PKR) también pueden producir la activación de la respuesta antiviral (Fig. 8) (Jensen y Thomsen, 2012; Chow y col., 2015).

El TLR-3 se expresa fundamentalmente en la membrana de endosomas y lisosomas de células presentadoras de antígeno. Sin embargo, los RLRs son proteínas citoplásmicas que se expresan en la mayoría de tipos celulares. Entre éstos, los principales son las helicasas gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) y gen-5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5). RIG-I y MDA5 contienen un dominio helicasa que media la interacción con el dsRNA y dos dominios reclutadores de caspasa, que son activados al producirse la unión al dsRNA por el dominio helicasa (Mogensen, 2009; Jensen y Thomsen, 2012). Así se inicia una cascada de señalización mediada por la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) que termina con la activación del factor 3 regulador del interferón (IRF-3) y el factor

nuclear kappa B (NF- κ B). La translocación de estos factores al núcleo lleva a la expresión de IFN de tipo I y citoquinas proinflamatorias (Fig. 8). RIG-I reconoce principalmente ssRNA 5'-trifosforilados y dsRNAs cortos (<300 bp), mientras que MDA5 reconoce principalmente dsRNAs de mayor longitud (Kato y col., 2006). En el caso de CoVs, MDA5 ha sido identificado como el principal sensor de dsRNA en células no inmunes (Zust y col., 2011; Menachery y col., 2014; Zalinger y col., 2015). Además de los anteriores, se han identificado otras proteínas que podrían funcionar en el reconocimiento de dsRNA en el citoplasma, incluyendo proteínas de la familia de la proteína ausente en el melanoma 2 (AIM2) o helicasas del tipo DEAD-box (DDX) entre otras (Zhang y col., 2011).

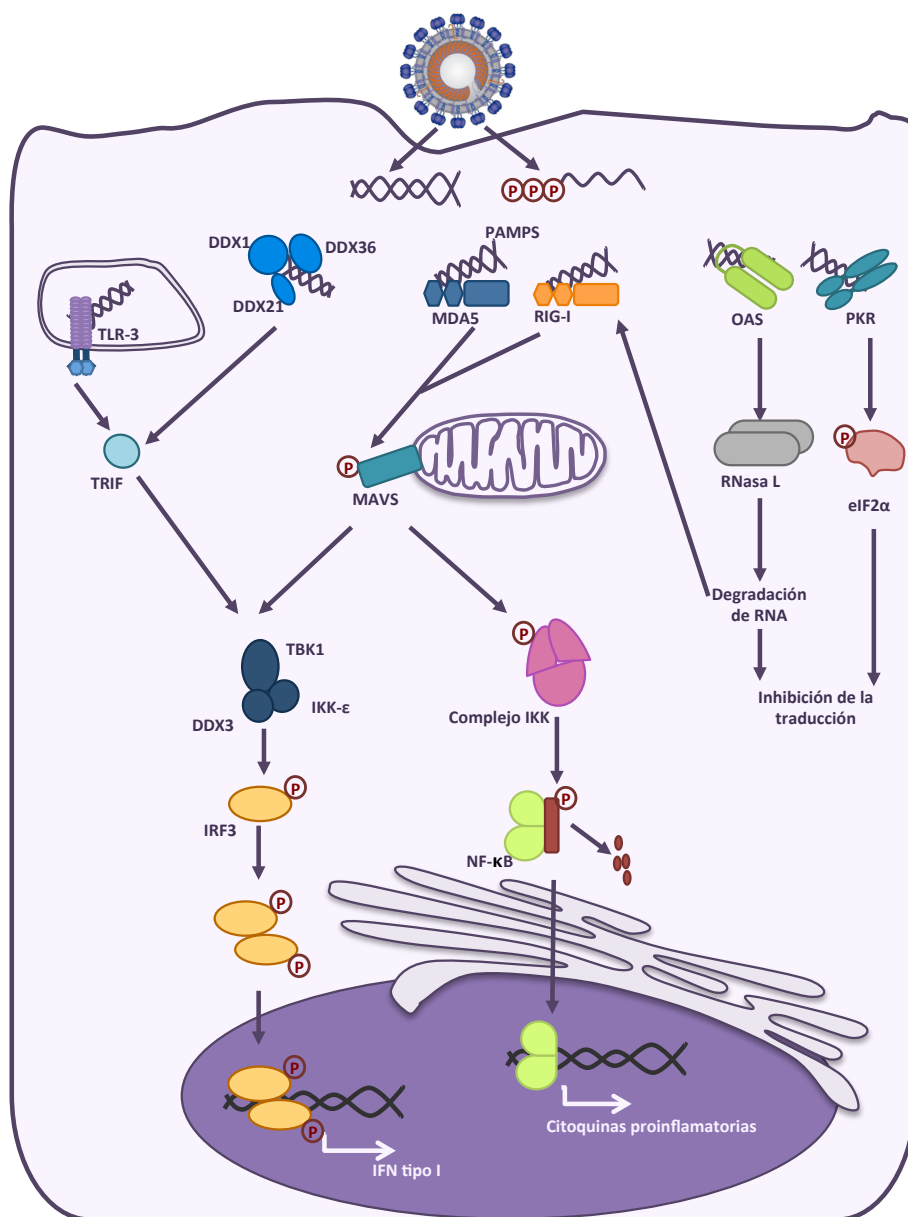


Figura 8. Respuesta antiviral activada por dsRNA. Esquema del reconocimiento de dsRNA por los sensores celulares, las vías de señalización activadas y la respuesta celular final.

5.2. Mecanismos para contrarrestar la respuesta antiviral mediada por dsRNA en CoVs

Los CoVs replican en el citoplasma, donde producen distintas especies de dsRNA que activan la respuesta antiviral. Para contrarrestar esta respuesta, han desarrollado diversas estrategias que permiten evitar su activación, o evitar la inducción de IFN en distintas etapas de la señalización (Totura y Baric, 2012; Kindler y Thiel, 2014). Así, se ha propuesto que las DMVs, además de conferir el ambiente y condiciones necesarias para la síntesis del RNA viral, tendrían la función de ocultar los intermediarios replicativos de dsRNA a los sensores citoplasmáticos, previniendo la activación de la respuesta antiviral (Gosert y col., 2002; Snijder y col., 2006; Zinzula y Tramontano, 2013). También se ha descrito que varias proteínas virales, como la proteína N o la proteína 4a del MERS-CoV, interactúan con el dsRNA para evitar su reconocimiento por los sensores celulares (Lu y col., 2011; Totura y Baric, 2012; Siu y col., 2014). Además, los CoVs disponen de una maquinaria de síntesis del 5'cap que les permite sintetizar RNAs estructuralmente análogos a los mRNAs celulares y evitar la activación de la respuesta antiviral (Zust y col., 2011; Kindler y Thiel, 2014).

Por otra parte, los CoVs han desarrollado mecanismos para interferir activamente en la señalización de la respuesta antiviral. En este sentido, las proteínas N y ns2 del MHV inhiben la activación de la RNasa L (Ye y col., 2007; Zhao y col., 2012). En el TGEV, se ha descrito que la proteína 7 contrarresta la fosforilación del eIF2 α y bloquea las vías de la PKR y de la OAS, impidiendo también la activación de la RNasaL (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013). Las proteínas M y nsp3 del SARS-CoV secuestran el complejo TBK/IKK/IRF3 impidiendo la activación del IRF3 (Devaraj y col., 2007). La proteína 3b del SARS-CoV bloquea la señalización mediada por los RLRs al interactuar con la MAVS (Freundt y col., 2009), y las proteínas N y 6 del SARS-CoV bloquean la activación del IRF3 (Kopecky-Bromberg y col., 2007). Además, se han descrito otras proteínas de CoV que antagonizan la respuesta antiviral por mecanismos aún desconocidos (Totura y Baric, 2012).

OBJETIVOS

Los CoVs presentan un gran potencial para su uso como vectores en el desarrollo de vacunas que puedan usarse en salud humana y animal. Sin embargo, su limitada estabilidad supone un inconveniente para su utilización. El objetivo principal de esta tesis es la mejora de los vectores basados en el genoma de CoVs aumentando su estabilidad y su grado de atenuación. Como modelo experimental se ha utilizado el TGEV para la expresión de proteínas del PRRSV. Los objetivos específicos abordados en este trabajo son los siguientes:

- 1.** Mejorar la estabilidad del vector derivado del TGEV para la expresión de proteínas del PRRSV. Para ello se diseñarán estructuras antigénicas que contengan los dominios potencialmente implicados en la inducción de respuestas inmunes protectoras frente al PRRSV.
- 2.** Evaluar sistemáticamente la estabilidad de los vectores del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV, con el fin de seleccionar un conjunto de rTGEVs con una estabilidad mejorada para su evaluación *in vivo*.
- 3.** Estudiar los diferentes dominios de la proteína nsp14 como posibles dianas para la atenuación de vectores basados en el genoma de CoVs.
- 4.** Analizar la relevancia de la proteína nsp14 en la inducción de la respuesta inmune innata.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CÉLULAS EUCARIOTAS

1.1. Líneas celulares

La línea celular epitelial ST (McClurkin y Norman, 1966), derivada de testículo embrionario de cerdo (*Sus scrofa*) fue cedida al laboratorio por el Dr. L. Kemeney (National Animal Disease Center, Ames, Iowa, EE.UU.). Las líneas celulares epiteliales BHK-21, derivada de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*), y BHK-pAPN (Delmas y col., 1992), derivada de la anterior y transformada establemente con el gen que codifica la aminopeptidasa N porcina, fueron cedidas al laboratorio por el Dr. H. Laude (Unité de Virologie Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, Francia). Las líneas celulares BHK y BHK-pAPN se transfectaron con el replicón del virus Sindbis (Frolov y col., 1996) que expresaba la proteína N del TGEV para obtener, respectivamente, las líneas BHK-N y BHK-pAPN-N. La línea celular MARC-145 (Kim y col., 1993), subclón de la línea celular epitelial MA104, derivada de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) fue cedida al laboratorio por la empresa INGENASA (Madrid, España). La línea celular High Five (H5), derivada de células de ovario del gusano medidor del repollo (*Trichoplusia ni*) fue cedida al laboratorio por el Dr. A. Alcamí (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España).

1.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares ST, BHK-21, BHK-pAPN y MARC-145 se crecieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con una humedad del 98%, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 100 UI/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino (FBS) al 10%. En el caso de las células BHK-pAPN, cada cuatro pases se añadió al medio geneticina (G418) (Sigma-Aldrich), a una concentración final de 1.5 mg/ml en el medio de cultivo. La selección de las líneas que expresaban la proteína N a partir del replicón del virus Sindbis se realizó añadiendo puromicina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5 µg/ml en el medio de cultivo. Las células H5 se crecieron a 29°C en medio TC100 (Gibco) suplementado con FBS al 10%, 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich), 0.25 µg/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich), 100 UI/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich) y antimicótico al 0.02% (Sigma-Aldrich). Todas las líneas celulares se almacenaron

mediante congelación en nitrógeno líquido a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/ml en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10% en FBS.

1.3. Obtención de cultivos primarios de macrófagos porcinos

Los cultivos primarios de macrófagos porcinos se obtuvieron por diferenciación de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), purificadas a partir de sangre de cerdo. Para ello, se extrajo sangre en condiciones estériles, por punción de la vena cava anterior. La sangre extraída pasó a un desfibrinador mecánico donde se agitó durante 15-30 minutos. La sangre desfibrinada se centrifugó a $1000\times g$ durante 30 min, obteniéndose tres fases. La fase superior, correspondiente al suero, se recogió en condiciones estériles para ser usado en el medio de cultivo de los PBMCs (suero autólogo), la interfase, que contenía los PBMCs, se extrajo por capilaridad, evitando recoger un exceso de la fase inferior, formada por eritrocitos. La interfase recogida se enfrió en hielo, y se resuspendió en tres volúmenes de tampón de lisis de eritrocitos (0.15 M NH_4Cl , 0.01 M HKCO_3 , 0.1 mM EDTA) por volumen de interfase obtenido, incubándose durante aproximadamente 15 minutos, controlando el proceso por observación al microscopio óptico. Se centrifugó a $1000\times g$ durante 15 min, y se repitió el proceso una vez más. Se retiró el sobrenadante y los leucocitos limpios se resuspendieron y congelaron en suero autólogo descomplementado, suplementado con un 10% de DMSO, a una concentración final de 3×10^8 células/ml.

Para la obtención de macrófagos a partir de los PBMCs purificados, 6×10^8 PBMCs se sembraron en placas de 90 mm de diámetro en medio medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich) suplementado con 100 UI/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma-Aldrich) y 40% de suero de cerdo autólogo descomplementado. Tras 48 horas (h) de incubación a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% con humedad del 98%, las células no adheridas se retiraron mediante lavados con medio de cultivo, mientras que los macrófagos diferenciados quedaron adheridos a la superficie de la placa, mostrando una confluencia aproximada del 80%.

1.4. Sincronización de cultivos celulares

Células ST crecidas a una confluencia del 30 al 50% en medio de cultivo con FBS al 10% se sincronizaron eliminando el suero del medio, como se ha descrito previamente (Langan y Chou, 2011). Brevemente, las células se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄, pH7.4) y se incubaron durante 48 h a 37°C con medio de cultivo al 0.1% de FBS. Se estimó que a este tiempo el 85- 95% de las células se encontraban en reposo (fase G₀). Para provocar nuevamente la entrada en el ciclo celular, las células se incubaron durante 4 h a 37°C con medio de cultivo al 10% de FBS.

2. VIRUS

2.1. Aislados virales

El aislado del TGEV PUR46-MAD (código de acceso *GenBank* AJ271965) corresponde al clon PUR46-CC120-MAD aislado en nuestro laboratorio, que deriva del aislado Purdue del TGEV, obtenido en el año 1946 en Indiana (EE.UU.) por Doyle y Hutchings (Sanchez y col., 1990; Penzes y col., 2001). Los virus recombinantes rescatados a partir de la transfección del clon infectivo del TGEV (rTGEV) presentan el fondo genético del aislado del TGEV PUR46-MAD con la excepción del gen S, derivado del aislado rTGEV-S_{7.1}, que presenta tropismo entérico y respiratorio (Almazan y col., 2000; Ortego y col., 2003) (C.M. Sanchez, M. Becares, S. Zuñiga y L. Enjuanes, manuscrito en preparación).

El aislado del PRRSV Olot91 (código de acceso *GenBank* KC862570) corresponde al clon ESP-1991-Olot-91, aislado en el año 1991 en Olot (España) (Plana-Durán y col., 1992) pasado al menos cinco veces en células MARC-145, habiéndose adaptado su crecimiento a este tipo celular (Kvisgaard y col., 2013). La cepa virulenta del PRRSV Olot91 (PRRSV-Olot91-like) fue aislada en macrófagos alveolares porcinos a partir de sueros de cerdos infectados en brotes del PRRSV ocurridos en el norte de España en diciembre de 1991. El virus crecido durante 7 pases en macrófagos alveolares porcinos fue altamente virulento, especialmente en cerdas gestantes (Plana-Durán y col., 1992).

2.2. Crecimiento y titulación de virus en cultivos celulares

Los rTGEVs se crecieron y titularon en células ST siguiendo protocolos descritos previamente (Correa y col., 1988). Para la generación de lotes de virus, monocapas de

células ST se crecieron hasta el 100% de confluencia y se infectaron 24 horas después a una multiplicidad de infección (moi) de 0.1-1 unidades formadoras de placa (pfu) por célula. El sobrenadante de esta infección se recogió entre 16 y 20 horas después de la infección (hpi) y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

El tamaño de placa de lisis se estimó midiendo el área de las placas de lisis en imágenes obtenidas de monocapas celulares infectadas fijadas con formaldehído y teñidas con cristal violeta, utilizando el *software* ImageJ (Abramoff y col., 2004).

La cepa PRRSV-Olot91 adaptada a cultivos celulares se creció en células MARC-145, siguiendo protocolos descritos previamente (Kim y col., 1993). Para la generación de lotes de virus, se crecieron monocapas de células MARC-145 hasta el 100% de confluencia, y se infectaron a una moi de 1. El sobrenadante se recogió 48 hpi y se almacenó a -80°C hasta su utilización. La titulación de esta cepa se realizó por el método de formación de placas de lisis en medio semisólido. Para ello, monocapas confluentes de células MARC-145 crecidas en placas de 12 pocillos se incubaron con diluciones seriadas de los virus en medio de cultivo suplementado con FBS (Hyclone) al 2% durante 45 minutos a 37°C. Se retiró el medio de adsorción y se añadió medio *overlay* [DMEM (Gibco) suplementado con 100 UI/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma-Aldrich), FBS (Hyclone) al 2% , DEAE-dextrano-500 (Sigma-Aldrich) al 1% y agar al 0.5%]. A las 72 hpi, las células se fijaron por incubación con formaldehído al 10% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron con una solución de cristal violeta (0.1% cristal violeta, 20% metanol en agua) y se contó el número de placas de lisis presente en cada caso.

La cepa virulenta PRRSV-Olot91-like, utilizada para los experimentos de protección, se creció en macrófagos porcinos obtenidos a partir de la diferenciación de PBMCs. Macrófagos diferenciados a un 80% de confluencia se infectaron con 10⁵ TCID₅₀ del pase 7 del virus parental PRRSV-Olot91-like. El sobrenadante se recogió 72 hpi, cuando el efecto citopático era evidente y se almacenó a -80°C hasta su utilización. La titulación del lote de virus se llevó a cabo en macrófagos porcinos siguiendo protocolos anteriormente descritos (Duan y col., 1997).

2.3. Purificación parcial de los virus TGEV y PRRSV

Los sobrenadantes de células ST infectadas con el TGEV PUR46-MAD o células MARC-145 infectadas con el PRRSV-Olot91 se recogieron cuando el efecto citopático era del 80%, y se clarificaron por centrifugación a 6000xg durante 20 min a 4°C. Para la purificación del TGEV, el sobrenadante clarificado se sedimentó por ultracentrifugación a 112000xg durante 2 h a 4°C a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón TEN (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 1M NaCl) suplementado con Tween al 0.2%. El sedimento que contenía los virones se resuspendió en tampón TNE (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) suplementado con Tween al 0.2%. y se sedimentó por ultracentrifugación a 112000xg durante 1 h a 4°C. Este sedimento final se resuspendió por incubación en TNE durante 16 h a 4°C. Para la purificación del PRRSV, el sobrenadante clarificado se sedimentó por ultracentrifugación a 112000xg durante 3 h a 4°C a través de un colchón de sacarosa al 30% en PBS. El sedimento que contenía los virones se resuspendió en PBS y se sedimentó por ultracentrifugación a 112000xg durante 1 h a 4°C. Este sedimento final se resuspendió por incubación en PBS durante 16 h a 4°C. En ambos casos, la solución que contenía los viriones purificados se inactivó mediante luz ultravioleta (UV). La concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los virus parcialmente purificados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3. BACTERIAS

3.1. Cepas y cultivos de bacterias

La cepa DH10B de *E. coli* (Gibco), cuyo genotipo es *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK l-rpsL nupG*, se utilizó rutinariamente para la clonación y amplificación de plásmidos.

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001) a 30°C o a 37°C, según se indique. El medio sólido se preparó añadiendo al LB agar a una concentración de 15 g/l y se utilizó para el aislamiento de colonias bacterianas. El medio se suplementó con los antibióticos adecuados [150 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) o 12.5 µg/ml de cloranfenicol (Sigma-Aldrich)] cuando fue necesario.

3.2. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias DH10B competentes para electroporación se prepararon partiendo de una colonia única crecida en medio sólido, la cual se inoculó en dos litros de medio *Super Optimal Broth* (SOB) [20 g/l triptona (Becton, Dickinson and Company), 5 g/l extracto de levadura (Becton, Dickinson and Company), 0.5 g/l NaCl (Sigma-Aldrich), 0.18 g/l KCl (Sigma-Aldrich)] y se creció a 37°C hasta alcanzar una absorbancia a una longitud de onda de 550 nm (A_{550}) de 0.7. A continuación, el cultivo se enfrió a 4°C durante 20 min, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000xg durante 15 min, y se lavaron tres veces con una solución de glicerol al 10% a 4°C, utilizando un volumen equivalente al del cultivo inicial en el primer lavado, que se fue reduciendo a la mitad en los sucesivos lavados (2 l, 1 l, 0.5 l, y 0.25 l respectivamente). En cada lavado las bacterias se resuspendieron a 4°C y se sedimentaron a 4000xg durante 15 min. El sedimento final se resuspendió en 6 ml de glicerol al 10% a 4°C y se repartió en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su utilización.

3.3. Transformación de bacterias mediante electroporación

Las bacterias DH10B competentes se transformaron mediante electroporación con el DNA de interés libre de sales. Para ello, cuando fue necesario, el DNA se dializó con membranas hidrófilas de ésteres de celulosa de un tamaño de poro 0.025 μm (Millipore). El DNA dializado se mezcló con 50 μl de bacterias competentes. La mezcla DNA-bacterias competentes se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) donde se aplicó un pulso eléctrico de 25 μF , 2.5 kV y 200 Ω utilizando un electroporador *GenePulser* (Bio-Rad). Inmediatamente, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio LB, se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min y se sembraron por extensión en superficie sobre placas de medio LB-agar con el antibiótico de selección adecuado.

4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

4.1. Plásmidos

Los plásmidos pBlueScript II SK- (Stratagene), pMA-T (GeneArt) y pSL1190 (Pharma Biotech), de alto número de copia, se utilizaron para la clonación y modificación de cDNAs virales de hasta 9 Kbp.

El plásmido pBeloBAC11 (pBAC) (Wang y col., 1997), de 5 Kbp, contiene el origen de replicación del factor F de *E. coli* (*oriS*), el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y los genes necesarios para mantener una copia única del plásmido por célula (*parA*, *parB*, *parC* y *repE*). Este vector fue utilizado para la clonación y modificación de cDNAs virales de gran tamaño o que contuviesen secuencias tóxicas para su crecimiento en bacterias según lo descrito anteriormente (Almazan y col., 2000; Gonzalez y col., 2002).

4.2. Manipulación y purificación de plásmidos

Para la purificación de plásmidos de alto número de copia a partir de cultivos bacterianos a pequeña, mediana o gran escala se utilizaron los reactivos *Plasmid Mini Kit*, *Plasmid Midi Kit* o *Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la purificación a gran escala de plásmidos de bajo número de copia (pBACs) se empleó el reactivo *Large Construct Kit* (QIAGEN). En este caso se partió 500 ml del cultivo bacteriano crecido a 30°C en medio LB suplementado con 12.5 µg/ml de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) durante 18 h aproximadamente, partiendo de un preinóculo de 10 ml de cultivo.

4.3. Enzimas de restricción y modificación de DNA

Las enzimas de restricción y modificación de DNA (DNA ligasa del fago T4, DNA polimerasa del fago T4 y fosfatasa alcalina de gamba) se adquirieron de Roche o New England Biolabs. Los tratamientos enzimáticos de restricción, desfosforilación o ligación de DNA se realizaron siguiendo protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001) y las indicaciones de los proveedores. Todas las construcciones generadas se confirmaron mediante secuenciación en la empresa Macrogen (Seúl, Korea).

4.4. Amplificación del DNA mediante PCR

Las reacciones de PCR con fines analíticos se realizaron utilizando la enzima *Amplitaq DNA polymerase* (Applied Biosystems). En el caso de las reacciones de PCR con fines preparativos se empleó la enzima *Vent polymerase* (New England Biolabs) que posee actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores y, por lo tanto, mayor fidelidad. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *SimpliAMPTM* (Applied Biosystems), utilizando un volumen final de reacción de 50 µl, utilizando 1 U de *Amplitaq*

DNA polymerase ó 2.5 U de *Vent polymerase*, 20 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Life Technologies) a una concentración final de 0.25 mM, 1.25 ó 2 mM de $MgCl_2$ para las enzimas *Amplitaq DNA polymerase* o *Vent polymerase*, respectivamente y entre 25 y 50 ng de DNA molde por reacción. Las condiciones de reacción se ajustaron en función de temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (T_m) y la longitud del fragmento a amplificar, de la siguiente forma: (a) 94°C, 5 minutos; (b) 25-35 ciclos de 94°C, 1 minutos; (T_m -10°C), 1 minutos; 72°C, 1 minuto/Kbp; (c) 72°C, 10 minutos.

4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA para estudios analíticos y su purificación se realizó en geles de agarosa D-1 Medio EEO (Pronadisa) al 0.7-1.2% en TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) con SYBR® *Safe DNA gel stain* 1x (Life Technologies).

5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

5.1. Construcción de plásmidos para introducción de genes heterólogos en el clon infectivo del TGEV

Para la expresión de proteínas del PRRSV, o proteínas recombinantes que contenían epítomos de las proteínas del PRRSV, las secuencias codificantes se introdujeron reemplazando los genes no esenciales 3a y 3b del TGEV.

Las secuencias codificantes para los productos GP3fr, GP4fr, GP5fr, E2-A, E2-BC, GP3ep-Mloop y GP3ep-NtermM se obtuvieron por síntesis química, y clonadas en el vector pMA-T (GeneArt, Alemania). Todas estas secuencias estaban optimizadas para su expresión en células de mamífero, y contenían el epítomo FLAG para facilitar su detección, como se especifica en la Tabla II. Además estaban precedidas por una secuencia optimizada de Kozak (GCCACC) adyacente al codón de inicio en cada caso, con el objetivo de mejorar la expresión de la proteína, y flanqueadas por sitios de restricción para las enzimas *PpuMI* (AGGTCCT) en el extremo 5' y *BlnI* (GCTCGAGC) en el extremo 3', respectivamente.

Las secuencias codificantes para las proteínas GP4, GP5ecto, y M se generaron mediante PCR empleando los oligonucleótidos cuya secuencia se detalla en la Tabla III, y el plásmido pSL-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 (Cruz y col., 2010) como molde. En todos los casos se introdujeron los sitios de restricción para las enzimas *PpuMI* y *BlnI* en los extremos 5' y 3',

respectivamente. Estos fragmentos generados por PCR se clonaron en el plásmido pBluescript II SK-, previamente digerido con *EcoRV*.

Tabla II. Estructura de las proteínas fusión del PRRSV expresadas con vectores basados en el genoma del rTGEV

PROTEÍNA DE FUSIÓN	SEGMENTO 1 ^(a)	SEGMENTO 2	SEGMENTO 3	SEGMENTO 4
GP3fr	GP3 (1-28)	GP3(51-77)	FLAG ^(b)	-
GP4fr	GP4 (1-25)	GP4 (51-75)	FLAG	-
GP5fr	GP5 (35-68)	FLAG	-	-
E2-A	E2 (1-20)	E2 (127-192)	-	-
E2-BC	E2 (1-74)	-	-	-
GP3ep-Mloop	M (1-66)	FLAG	GP3 (51-77)	M (67-173)
GP3ep-NtermM	FLAG	GP3(51-77)	M (1-173)	-

(a) Los números entre paréntesis indican los aminoácidos de las proteínas del PRRSV incluidas en la proteína de fusión.

(b) La secuencia de aminoácidos del epítipo FLAG es DYKDDDDK.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de proteínas heterólogas en el clon infeccioso del rTGEV

RECOMBINANTE	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA 5'-3' ^(a)
Gp5ecto	PpuMI_HA_ORF5_VS	GCAGGTCCTATGTACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCCATGAG ATGTTCTCACAATTTGGGGC
	ORF5_68_Blp_RS	GCGCTCAGCTCAGGTCTCGACTGCCCAATCAAATG
GP4	PpuMI_Orf4_VS	GCAGGTCCTATGGCCGCTGCCATCCTG
	Blp_Orf4_RS	GCGCTCAGCGCTTAGATGGCCAGCA
M	PpuMI_Orf6_VS	GCAGGTCCTATGGGAAGCCTAGACGATTTTTG
	Blp_Orf6_RSnew	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
TRS _{22N} -M	BmgBI_finalS_TRS22N_VS	AGGCACGTCCTATTAATGGAAGCTTCAGCTGGTCTATAATATTGAT CG
	Blp_ORF6_RS_new	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
TRM ^{opt} -TRS _{3a} -M	5'	AvrII+BmgBI-S.end
		AGGCACGTCCTATTAATGGAAGCTTCAGCTGGTCTATAATATTGAT CG
	3'	3'ENHTRS3a-RS
		ACAGGACCTGTAATGACGCGTAAGTTAGTTATACCATATGTAA TAATTTTCTTG
TRM ^{opt} -TRS _{22N} -M	5'	3'ENHTRS3a-VS
		CAAGAAAAATTATTACATATGGTATAACTAACTTACGCGTCAT TACAGGTCCTGT
	3'	Blp_Orf6_RSnew
		GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
TRM ^{opt} -TRS _{22N} -M	5'	AvrII+BmgBI-S.end
		AGGCACGTCCTATTAATGGAAGCTTCAGCTGGTCTATAATATTGAT CG
	3'	3'ENH-TRS22N-ORF6-RS
		CTAGGCTTCCATTTTGTGTTAGTTATACCATATGTAATAATTTT TCTTG
	3'	3'ENH-TRS22N-ORF6-VS
		CAAGAAAAATTATTACATATGGTATAACTAAACAAATGGGAAG CCTAG
		Blp_ORF6_RS_new
		GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG

(a) Las dianas de restricción para las enzimas *PpuMI*, *BlpI* o *BmgBI* se indican subrayadas.

Todos los plásmidos pMA-T o pBlueScriptII SK- se digirieron con las enzimas *PpuMI* y *BlnI* y los insertos correspondientes se clonaron en los mismos sitios del plásmido pSL-TGEV-S_{7.1} que incluye los nucleótidos 22973 al 25873 del genoma del TGEV. De esta forma, los fragmentos introducidos en el vector reemplazaron los genes no esenciales 3a y 3b del TGEV, y la expresión del gen introducido se regula por la TRS del gen 3a, generándose los vectores pSL-TRS_{3a}-GP3fr, pSL-TRS_{3a}-GP4fr, pSL-TRS_{3a}-GP5fr, pSL-TRS_{3a}-E2-A, pSL-TRS_{3a}-E2-BC, pSL-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop, pSL-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM, pSL-TRS_{3a}-GP5ecto, pSL-TRS_{3a}-M y pSL-TRS_{3a}-GP4.

La introducción de la secuencia reguladora de la transcripción TRS_{22N} y el motivo regulador de la transcripción (TRM^{opt}) (Mateos-Gomez y col., 2011) para la modificación de los niveles de expresión de la proteína M del PRRSV se realizó mediante PCR. La secuencia de la TRS_{22N} se introdujo en el extremo 5' de la secuencia del gen M empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla III y el plásmido pSL-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 como molde. Para la introducción de la secuencia del TRM^{opt} se generaron dos fragmentos de PCR solapantes. Para la síntesis fragmento 5', que incluía la secuencia del TRM^{opt} se empleó el plásmido pB-TRM(19)3a (Mateos-Gomez y col., 2011) como molde y los oligonucleótidos indicados en la Tabla III. El fragmento 3', que incluía la secuencia codificante de la proteína M del PRRSV se sintetizó utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla III y los plásmidos pSL-TRS_{3a}-ORF6 y pSL-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 como molde para los recombinantes TRM^{opt}-TRS_{3a}-M y TRM^{opt}-TRS_{22N}-M, respectivamente. Los dos fragmentos solapantes se unieron empleando los oligonucleótidos AvrII+BmgBI-S.end y BlnI_ORF6_RS_new. Los fragmentos finales generados por PCR se clonaron en el plásmido pBluescript II SK-, previamente digerido con *EcoRV*, desde donde se digirieron con las enzimas *BmgBI* y *BlnI* y se clonaron en los sitios homólogos del vector pSL-TGEV-S_{7.1} generando los plásmidos intermedios pSL-TRS_{22N}-M, pSL-TRM^{opt}-TRS_{3a}-M y pSL-TRM^{opt}-TRS_{22N}-M.

Para la expresión bicistrónica de los fragmentos de la proteína GP5 del PRRSV, GP5ecto y GP5fr junto con la proteína M del PRRSV, los vectores pSL-TRS_{3a}-GP5ecto y pSL-TRS_{3a}-GP5fr se digirieron con la enzima *BlnI*, introduciéndose en esa posición la secuencia de la proteína M, precedida de la TRS_{22N}, obtenida a partir del plásmido pSL-TRS_{3a}-ORF5-TRS_{22N}-ORF6 en el que se encontraba flanqueada por dos sitios de restricción para esta enzima. De esta forma, se generaron los plásmidos pSL-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M y pSL-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M.

Finalmente, todos los plásmidos intermedios se digirieron con la enzima *AvrII* y los insertos que contenían las secuencias del PRRSV se clonaron en el vector pBAC-rTGEV-S_{7.1} utilizando los mismos sitios de restricción, generando los plásmidos pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP3fr, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP4fr, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-E2-A, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-E2-BC, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP4, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-M, pBAC-S_{7.1}-TRS_{22N}-M, pBAC-S_{7.1}-TRM^{opt}-TRS_{3a}-M, pBAC-S_{7.1}-TRM^{opt}-TRS_{22N}-M, pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M y pBAC-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M.

5.2. Construcción de plásmidos para la mutagénesis de la proteína nsp14

La mutagénesis dirigida de la proteína nsp14 se realizó por mediante la obtención de dos fragmentos de PCR solapantes. Para la síntesis del fragmento 5' se empleó en todos los casos el oligonucleótido VS nsp13fin_VS (5'-CATGTGTGATAGAACTATGTATGAGAATCTTG-3') junto con el oligonucleótido RS que se indica en la Tabla IV. Para la síntesis del fragmento 3' se empleó en cada caso el oligonucleótido VS indicado en la Tabla IV, y el oligonucleótido RS nsp15prin_RS (5'-CCATTATTTTGTGTCAGCAATAACAGCAG-3') en todos los casos. Los dos fragmentos solapantes se unieron empleando los oligonucleótidos externos nsp13fin_VS y nsp15prin_RS.

Los productos de PCR se digirieron con *BstBI* y *XbaI* y se introdujeron en el vector, pSL-nsp14, generado previamente y que incluye los nucleótidos 15063 al 21504 del genoma del TGEV, digerido con las mismas enzimas. Los vectores pSL intermedios generados se digirieron con las enzimas *NheI* y *PacI*, y los insertos se clonaron en los sitios homólogos del pBAC-REP-2 (Almazan y col., 2004) para la generación de los replicones mutantes pBAC-REP-2-nsp14*-Exol, pBAC-REP-2-nsp14*-ExoIII, pBAC-REP-2-nsp14*-ZF-H, pBAC-REP-2-nsp14*-ZF-C, pBAC-REP-2-nsp14*-N7MTasa, pBAC-REP-2-nsp14*-CtermI, pBAC-REP-2-nsp14*-CtermII, pBAC-REP-2-nsp14*-CtermIII, pBAC-REP-2-nsp14*-CtermIV y pBAC-REP-2-nsp14*-CtermV.

Para la generación de los cDNAs infectivos con las mutaciones en el gen de la proteína nsp14, los plásmidos pSL intermedios correspondientes se digirieron con las enzimas *NheI* y *PacI*, y se clonaron en los mismos sitios del pBAC-TGEV-S_{7.1} dando lugar a los plásmidos pBAC-S_{7.1}-nsp14*-Exol, pBAC-S_{7.1}-nsp14*-ExoIII, pBAC-S_{7.1}-nsp14*-ZF-H, pBAC-S_{7.1}-nsp14*-ZF-C, y pBAC-S_{7.1}-N7MTasa.

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de la proteína nsp14

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3') ^(a)
nsp14*-ExoI	ExoI_VS	CTTGGGTTTG CAGTTGCT GGTGACATG
	ExoI_RS	CATGTGCACC AGCAACTG CAAACCCAAG
nsp14*-ExoIII	ExoIII_VS	GCTAGTGGTG CGGCTATC ATGACTAG
	ExoIII_RS	CTAGTCATGATAGC CGC ACCACTAGC
nsp14*-ZF-H	ZF-H_VS	CAAAAAATGTGAAC CAC GGCAAAAG
	ZF-H_RS	CTTTTGCCG TG TTACATTTTTG
nsp14*-ZF-C	ZF-C_VS	GCTTGCTTCAAG TG TGCATTAGGATG
	ZF-C_RS	CATCCTAATGCAC ACT TGAAGCAAGC
nsp14*-N7MTasa	N7MTasa_VS	GCTTGCTTCAAG TG TGCATTAGGATG
	N7MTasa_RS	GATTACCCAC CG CGTGAATTGCAGC
nsp14*-CtermI	CtermI_VS	GAATGGTCTTATGTTA-ATGTACCCAGAGTTTTTC
	CtermI_RS	GAAAACTCTGGGTACAT-TAACATAAGACCATTTC
nsp14*-CtermII	CtermII_VS	CAATTGTTTGTAGATT-TTGTCTTTAGAAGGTTG
	CtermII_RS	CAACCTTCTAAAGACAA-AAATCTACAAACAATTG
nsp14*-CtermIII	CtermIII_VS	GTTGTAATGGTGGTGCA-GCTAAGCTTAAACCTATG
	CtermIII_RS	CATAGGTTTAAAGCTTAGC-TGCACCACCATTACAAC
nsp14*-CtermIV	CtermIV_VS	CTAAGCTTAAACCTATG-AATTGTGAAGCTTGTG
	CtermIV_RS	CAACAAGTTCACAATT-CATAGGTTTAAAGCTTAG
nsp14*-CtermV	CtermV_VS	CACCTAAGTCAAATGTT-GCTCTTTACAGAGCGTATG
	CtermV_RS	CATACGCTCTGTAAAGAGC-AACATTTGACTTAAAGTG

(a) Los nucleótidos que introducen mutaciones puntuales respecto a la secuencia WT se indican en negrita. El punto de en el que se elimina secuencia se indica con un guión.

6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA

6.1. Extracción y purificación del RNA total intracelular

Para verificar la secuencia, analizar la estabilidad de los virus recombinantes generados, y cuantificar la expresión de los RNAs virales y celulares, se extrajo el RNA total de las células infectadas utilizando el reactivo *RNeasy Mini kit* (QIAGEN). El RNA purificado se cuantificó mediante espectrofotometría, utilizando *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, EEUU), y se guardó a -80°C hasta su utilización.

6.2. Análisis del RNA mediante RT-PCR

La síntesis de cDNAs o retrotranscripción (RT) a partir de los RNAs purificados se realizó con el reactivo *High Capacity cDNA RT Kit* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 100 ng de RNA como molde.

Una fracción del cDNA generado (1/20 a 1/10 del volumen de reacción) se utilizó como molde para su posterior amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos, según los protocolos descritos en el apartado 4.4. de esta sección.

6.3. Cuantificación de RNAs mediante RT-qPCR

La expresión diferencial de los RNAs mensajeros (mRNAs) virales o celulares se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), utilizando la tecnología SYBR® o TaqMan®, según se indique. La reacción de RT se realizó con el reactivo *High Capacity cDNA RT Kit* (Life Technologies) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

La tecnología SYBR® se utilizó para la cuantificación de mensajeros virales, empleando el reactivo *SYBR®Green PCR Master Mix* (Life Technologies) y oligonucleótidos específicos diseñados con el programa *Primer Express v2.0* (Life Technologies), indicados en la Tabla V. En todos los casos se comprobó experimentalmente que no formaran dímeros y se optimizó su concentración en la reacción de PCR. La tecnología TaqMan® se empleó para la cuantificación de mRNAs virales, empleando ensayos TaqMan®, compuestos por los oligonucleótidos y la sonda específicos para cada caso, indicados en la Tabla V, o celulares utilizando ensayos TaqMan® comerciales (Life Technologies) (Tabla VI) o un ensayo diseñado para la cuantificación del mRNA del gen de la OAS1 porcina (Cruz y col., 2011). En todos los casos, la reacción se realizó con el reactivo *FastStart Universal Probe Master (Rox)* (Roche).

En todos los casos, la qPCR se realizó en un equipo *7500 Real Time PCR System* (Life Technologies), utilizando los parámetros de termociclación: (a) 95°C, 10 min; (b) 95°C; 15 seg; (c) 60°C, 1 min; (40 ciclos). Cuando se utilizó la tecnología SYBR®, al final de la PCR se añadió un paso de rampa de desnaturalización desde 60°C (T_m de los oligonucleótidos) hasta 95°C para el análisis de la curva de disociación del producto amplificado. Los datos se analizaron utilizando el programa *7500 software v2.0.6* (Life Technologies). Todos los experimentos cumplen con las recomendaciones para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (MIQE) {Bustin, 2009 #11559}. Para aumentar la fiabilidad de los resultados, en todos los casos se analizaron tres experimentos independientes, y cada muestra se analizó por triplicado. Los valores correspondientes a las medias de los valores de los ciclos de corte (C_t) se usaron para calcular los valores de expresión relativos utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ {Livak, 2001 #10334}. El nivel del gen de la beta-glucuronidasa (GUSB) se utilizó como control endógeno para normalizar la cuantificación de los mRNAs

celulares y el gRNA viral, dado que su expresión permanece invariable durante la infección con el TGEV, mientras que el nivel de los distintos sgRNAs virales se normalizó con el gRNA viral.

Tabla V . Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de RNAs virales mediante RT-qPCR

	AMPLICÓN	OLIGONUCLEÓTI DO	SECUENCIA (5'-3') ^(a)	TAMAÑO AMPLICÓN ^(b)
SYBR®	gRNA-TGEV	REP-VS	TTCTTTTGACAAAACATACGGTGAA	81
		REP-RS	CTAGGCAACTGGTTTGTAACATCTTT	
	TRS3a-M-PRRSV	Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAG	107
		TRS3a-ORF6-RS	AGGCTTCCCATAGGACCTGTAA	
	TRS22N-M-PRRSV	Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAG	115
		ORF6in-RS	CGGTAGAATCATTGCAAAAATCG	
TaqMan®	gRNA-TGEV	REP-VS	TTCTTTTGACAAAACATACGGTGAA	
		REP-RS	CTAGGCAACTGGTTTGTAACATCTTT	
		REP-MGB	FAM-AGGGCACCGTTGTCA-MGB	
	mRNA7-TGEV	Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAG	
		7(38)-RS	AAACTGTAATAAATACAGCATGGAGGAA	
		7-MGB	FAM-CGAACTAAACGAGATGCT-MGB	
	gRNA-PRRSV	Olot91_VS	TTCCCTCTGCTTGCAATCG	
		Olot91_RS	GGATGAAAGCGACGCAGTTC	
		Olot91_MGB	FAM-ACGGCTTTTAATCAAGGC-MGB	

(a) FAM, 6-carboxifluoresceína; MGB, grupo de unión al surco menor del DNA.

(b) El tamaño del amplicón resultante en la cuantificación mediante SYBR® se expresa en pares de bases.

Tabla VI. Ensayos TaqMan® utilizados para el análisis de genes celulares mediante RT-qPCR

GEN	ESPECIE	TAQMAN®
GUSB	Porcina	Ss03387751_u1
IFN-β	Porcina	Ss03375485_u1
TNF	Porcina	Ss03391318_g1
IRF-1	Porcina	Ss03388785_m1
MDA5	Porcina	Ss03386373_u1
RIG-I	Porcina	Ss03381552_u1
TGF-β	Porcina	Ss03382325_u1

7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS Y RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES

7.1. Experimentos de transfección de replicones del TGEV

Células BHK-N o BHK-pAPN-N crecidas al 80% de confluencia en placas de 12 pocillos

(M12) se transfectaron con 2 µg de los replicones correspondientes y 6 µl de *Lipofectamine 2000* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de un periodo de incubación de 6 h a 37°C, los complejos DNA-lipofectamina se retiraron mediante lavados con medio de cultivo y las células se incubaron con DMEM-5% FBS durante 18 h adicionales, tras lo cual el RNA total o las proteínas se recogieron para su posterior análisis. Para eliminar el cDNA transfectado de las muestras, que podría interferir en el posterior análisis, el RNA total se purificó (apartado 6.1.), y 7 µg del RNA purificado se trataron con 20 U de DNasa I (Roche) durante 30 min a 37°C en un volumen final de 100 µl. Posteriormente, los RNAs libres de DNA se limpiaron con el reactivo *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.2. Transfección y rescate de virus infecciosos a partir de los clones de cDNA

Células BHK-pAPN crecidas al 90% de confluencia en placas de 35 mm de diámetro en medio DMEM-10% FBS se transfectaron con 4 µg de los cDNAs infectivos correspondientes y 12 µl de *Lipofectamine 2000* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de un periodo de incubación de 6 h a 37°C, las células se levantaron con 200 µl de tripsina-EDTA (25%) y se añadieron sobre una monocapa confluyente de células ST crecidas en placas de 35 mm de diámetro. Después de un periodo de incubación de 48 h, se recogió el sobrenadante de las células (nombrado como pase 0). Los virus recombinantes rescatados se clonaron mediante tres pasos sucesivos de purificación de placas de lisis en medio semisólido que contenía 0.6% de agar. Los virus clonados se amplificaron mediante la infección de células ST crecidas en monocapa, y se titularon en células ST mediante formación de placas de lisis en medio semisólido siguiendo protocolos previamente descritos (Jimenez y col., 1986).

7.3. Transfección con el análogo de dsRNA poly (I:C)

Células ST crecidas al 100% confluencia en placas de 24 pocillos (M24) se transfectaron con 0.5 µg de poly (I:C) (Sigma-Aldrich) por pocillo con *Lipofectamine 2000*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de un periodo de incubación de 4 h a 37°C, se extrajo el RNA total para el análisis mediante RT-qPCR, de la respuesta inducida como se describe en el apartado 6.3. de esta sección.

8. ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LAS SECUENCIAS HETERÓLOGAS EN EL GENOMA DE LOS rTGEVs

La estabilidad de los distintos mutantes generados se analizó pasando los virus 16 veces sobre células ST. Para cada mutante generado, se aislaron dos clones independientes por purificación en medio semisólido a partir de pase 0, y se pasaron separadamente cada 24 h. En los pases 8 y 16 se obtuvo el RNA total de las células infectadas (apartado 6.1. de esta sección). Para la estimación de los niveles de estabilidad, a partir de los pases 8 y 16 se aislaron 10 clones independientes por formación de placas de lisis en medio semisólido. Células ST confluentes, crecidas en placas de 12 pocillos (M12) se infectaron con cada uno de los clones obtenidos. A 16 hpi se extrajo el RNA total, como se ha descrito en el apartado 6.1. de esta sección.

En todos los casos se analizó mediante RT-PCR la presencia del mRNA heterólogo correspondiente empleando el oligonucleótido SP (5'-GTGAGTGTAGCGTGGCTATATCTCTTC-3') que hibrida en la región *leader* y un oligonucleótido RS específico a cada sgRNA heterólogo (Tabla VII), así como la región del RNA genómico en la que se habían introducido los genes heterólogos empleando en todos los casos los oligonucleótidos S-4310VS (5'-ATTACGAACCAATTGAAAAAGTGC-3') y 3b-417RS (5'-CCGCCTGAGAAAAGGCTGCATTG-3'). Se analizó el tamaño de la banda amplificada, la aparición de bandas de tamaño inferior al esperado y la secuencia de todos los productos. Los tamaños de banda esperados para los productos amplificados así como los oligonucleótidos empleados en este análisis se detallan en la Tabla VII.

Tabla VII. Tamaño de banda y oligonucleótidos empleados en el análisis de la estabilidad de los vectores basados en el genoma de los rTGEVs mediante RT-PCR.

SECUENCIA HETERÓLOGA	TAMAÑO BANDA (bp)		OLIGONUCLEÓTIDO RS	SECUENCIA (5'-3')
	gRNA	mRNA ^(a)		
GP3fr	470	301	Flag-RS	TTTGTCGTCGTCGTCCTTGAATC
GP4fr	455	286	Flag-RS	TTTGTCGTCGTCGTCCTTGAATC
GP5 _{FL} -M	1433	690	561ORF5RS	GTCCTCGTCAAGGGTTGAGCT
GP5fr-M	983	241	Flag-RS	TTTGTCGTCGTCGTCCTTGAATC
GP5secto-M	1082	305	ORF568_BIPI_RS	GCGCTCAGCTCAGGTCTCGACTGCCCAATCAAAATG
E2-A	536	367	E2A_RS	CTCGTTCTCCACTGTGGTGGTC
E2-BC	503	334	E2BC_RS	GGCGGTCACTTTGAAGCTG

SECUENCIA HETERÓLOGA	TAMAÑO BANDA (bp)		OLIGONUCLEÓTIDO RS	SECUENCIA (5'-3')
GP4	820	655	Gp4_RS	GCTTAGATGGCCAGCA
M	793	637	Blp ORF6 rs	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
TRS22N-M	713	615	Blp ORF6 rs	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
TRM ^{opt} -TRS _{3a} -M	1037	637	Blp ORF6 rs	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
TRM ^{opt} -TRS _{22N} -M	957	615	Blp ORF6 rs	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
GP3fr-Mloop	898	742	Blp ORF6 rs	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG
GP3fr-NtermM	901	745	Blp ORF6 rs	GGGCTAAGCTTACCGGCCATACTTGACGAGG

(a) Los tamaños corresponden al mRNA de GP5_{FL}, GP5-fr, GP5ectoA o GP5ectoB, respectivamente.

9. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

9.1. Purificación de proteínas a partir de baculovirus recombinantes

Baculovirus recombinantes que expresaban las proteínas nsp14 del TGEV o GP3, GP4, GP5 y M del PRRSV fusionadas a una cola de 6 histidinas (6xHis) en su extremo amino terminal se obtuvieron del laboratorio de Fei Deng (Wuhan Institute of Virology, Wuhan China). Células H5 crecidas al 90% de confluencia en placas de 150 mm de diámetro se infectaron con estos baculovirus a una moi de 2. Las células se recogieron 60 hpi, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis BL1 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100) suplementado con el inhibidor de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich) al 1%, por cada 10^7 células. Los extractos se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4°C y los sedimentos se resuspendieron en el mismo volumen de tampón de lisis BL2 (8 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 1% IGEPAL, 1 mM β -mercaptoetanol). Las muestras se sonicaron tres veces consecutivas durante 20 segundos cada una y se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4°C. La proteína presente en el sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad metálica (IMAC) utilizando la resina de níquel *Ni-NTA agarose* (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se llevó a cabo por competición con imidazol utilizando 300 μ l de buffer de elución (200 mM imidazol, 8 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl 1% IGEPAL, 1 mM β -mercaptoetanol) por cada 10^7 células de partida. Durante la elución se recogieron fracciones que se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida-SDS (SDS-PAGE) y las proteínas se visualizaron utilizando el reactivo *EZBlue Staining Reagent* (Sigma). Las fracciones con mayor concentración de proteína se combinaron y se desalaron utilizando una columna de

exclusión molecular *PD-10 desalting colum* (GE-Healthcare) con el fin de eliminar la urea y otros compuestos residuales del proceso de purificación, eluyendo finalmente la proteína en PBS. La proteína purificada obtenida se cuantificó con el reactivo *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce), y se almacenó a -80°C hasta su uso.

9.2. Generación de sueros policlonales específicos para las proteínas nsp14 del TGEV y GP4 del PRRSV

Las proteínas nsp14 del TGEV o GP4 del PRRSV fusionadas a un epítipo de 6xHis en su extremo amino terminal se expresaron en células de insectos y se purificaron como se describe en el apartado 9.1. de esta sección. Estas proteínas se utilizaron como antígeno para la generación de anticuerpos policlonales en la empresa Biogenes GmbH (Alemania) mediante la inmunización de conejos, siguiendo procedimientos estándar.

9.3. Inmunomicroscopía de fluorescencia indirecta (inmunofluorescencia)

Células ST, crecidas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de cultivos de 24 pocillos a una confluencia del 70%, se infectaron a una moi de 0.5 con los rTGEVs correspondientes. Después de 8 h, las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron mediante incubación con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron mediante incubación con metanol frío durante 10 min. Para su análisis mediante inmunofluorescencia, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (10% FBS filtrado en PBS) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla VIII), diluido en solución de bloqueo durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células tres veces con PBS. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios específicos frente a ratón o conejo, en función del anticuerpo primario empleado, conjugados a los fluoróforos *Alexa 488* o *Alexa 594* (Life Technologies) diluidos 1:500 en solución de bloqueo. Después de la incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron cinco veces con PBS y los núcleos se tiñeron por incubación con el reactivo 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 1 mg/ml durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *ProLong Gold anti-fade reagent* (Life Technologies) y se examinaron con un microscopio

confocal *Leica SP5 laser scanning microscope* (Leica). Las imágenes se tomaron y procesaron con el programa *LASAF* (Leica).

Tabla VIII. Anticuerpos primarios utilizados

ANTICUERPO	TIPO ^(a)	ORIGEN	ESPECIE	DILUCIÓN DE TRABAJO ^(b)	
				IF	WB
Anti N (TGEV)-3DC10	mAb	Laboratorio CoV	Ratón	1:500	1:2000
Anti TGEV	pAb	Laboratorio CoV	Conejo	1:1000	-
Anti M (PRRSV)-EM11E10C7	mAb	INGENASA	Ratón	1:100	1:500
AntiGP4 (PRRSV)	pAb	Laboratorio CoV	Conejo	1:500	
Anti nsp14 (TGEV)	pAb	Laboratorio CoV	Conejo	1:1000	1:6000
Anti nsp 3 (TGEV)	pAb	Laboratorio CoV	Conejo	1:500	1:8000
Anti caspasa 3	pAb	Abcam	Conejo	-	1:1000
Anti dsRNA	pAb	Scientific Consulting	Ratón	1:200	-
AntiFLAG-M2	mAb	Sigma	Ratón	1:500	-
AntiHA	mAb	Sigma	Ratón	1:500	-
Anti β -actina	mAb	Sigma	Ratón	-	1:10000

(a) mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal

(b) IF, inmunofluorescencia; WB, *Western blot*

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia se llevó a cabo empleando el *software* ImageJ (Abramoff y col., 2004), midiendo la intensidad de fluorescencia media y la desviación estándar de la intensidad de fluorescencia en células individuales. Para realizar estas medidas se emplearon proyecciones de imágenes en escala de grises, para cada canal analizado, obtenidas con un microscopio confocal *Leica SP5 laser scanning microscope* (Leica).

9.4. Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Se generaron extractos de proteínas de células transfectadas o infectadas (a una moi de 5, 16 hpi), por lisis celular mediante incubación con una solución de extracción de proteínas [50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1x inhibidor de proteasas *Complete* (Roche)]. Las células lisadas se centrifugaron a 13000xg durante 10 min a 4°C y el sobrenadante, que contenía el extracto de proteínas citoplasmáticas se almacenó a -20°C hasta su utilización. Los extractos de proteínas se analizaron en geles desnaturizantes de gradiente de acrilamida-SDS *NuPAGE Novex 4-12% Bis/Tris Precast Gels* (Life Technologies) utilizando tampón de carga *NuPAGE Sample Buffer* (Novex, Life Technologies) suplementado con 100 mM de ditioneitol (DTT), utilizando *NuPAGE MOPS SDS Running*

Buffer (Novex, Life Technologies) como solución electrolito. Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Immobilon®-P PVDF*, Merk-Millipore), previamente activadas por incubación en metanol durante 5 minutos, mediante el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (Tabla VIII), diluidos en TBS con leche en polvo al 3% durante 12 h a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS (20 mM TRIS-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa del rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich), específico para la especie correspondiente al anticuerpo primario utilizado, diluido 1:30000 en TTBS con leche en polvo al 3%. Después de lavar exhaustivamente las membranas con TTBS, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el reactivo *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) y un captador de imágenes *ChemiDoc XRS⁺ System* (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando el programa *ImageLab 4.1* (Bio-Rad).

10. ENSAYO DE PROTECCIÓN EN CERDO

10.1. Declaración ética

Los protocolos de experimentación animal estuvieron en estricta conformidad con la directiva europea 2010/63/UE y la ley nacional RD 1201/2005 sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos, así como con la ley nacional 32/2007 referida al bienestar animal en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Todos los protocolos empleados fueron aprobados por el comité ético local.

10.2. Inmunización y desafío de cerdos

Cuarenta y cinco cerdos de doce días de edad, no deprivados de calostro y nacidos de madres seronegativas para los virus TGEV y PRRSV, fueron asignados aleatoriamente a tres grupos de quince cerdos cada grupo. Todos los animales fueron inoculados con los rTGEVs por tres rutas diferentes (oral, nasal e intragástrica) siguiendo procedimientos estándar (Sanchez y col., 1999). Los cerdos del grupo 1 (inmunizados) fueron inoculados con una

mezcla de 1×10^8 pfu/animal de cada uno de los siguientes rTGEVs: rTGEV-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP3fr, rTGEV-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP4fr, rTGEV-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP5fr-M, rTGEV-S_{7.1}-TRS_{3a}-M y rTGEV-S_{7.1}-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM. Los cerdos de los grupos 2 (no inmunizado) y 3 (control) fueron inoculados con 1×10^8 pfu/animal del rTGEV-S_{7.1}. Dos semanas después de la primera inoculación, todos los animales recibieron una inmunización de recuerdo en las mismas condiciones que la primera. Cuatro semanas después de la primera inmunización, los cerdos de los grupos 1 y 2 fueron desafiados con 10^6 TCID₅₀/animal de la cepa virulenta del PRRSV, PRRSV-Olot91-like, por ruta intranasal.

10.3. Seguimiento de la enfermedad y toma de muestras

Los animales fueron monitorizados diariamente con el fin de detectar los síntomas clínicos de la infección, así como posibles reacciones adversas a la inmunización. El peso de los animales se monitorizó cada 7 días. Se tomaron muestras de suero a los días 0, 14, 28, 31, 35, 38, 42, 49 y 56 después de la primera inoculación. A los días 35 y 56 después de la primera inoculación (7 y 28 después del desafío) se sacrificaron 5 y 10 animales por grupo, respectivamente. En el momento del sacrificio se evaluó la presencia de lesiones macroscópicas en el pulmón y se extrajeron muestras representativas de este órgano, que se guardaron en tubos estériles a -20°C hasta el momento de su utilización. El estudio de los síntomas clínicos y análisis de muestras se llevó a cabo en todo momento en forma de doble ciego.

10.4. Extracción de RNA de pulmón

Se utilizaron dos fragmentos representativos, de 300 mg cada uno, de los pulmones de los cerdos infectados. Cada uno de los fragmentos se homogenizó en 6 ml de tampón *RLT lysis buffer* (QIAGEN) suplementado con β -mercaptoetanol al 1%, empleando el sistema *gentleMACS Dissociator* (Milteny Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los homogenizados correspondientes a la misma muestra se combinaron y se centrifugaron a 3000xg durante 10 minutos. El RNA total se purificó a partir de los sobrenadantes utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN) como se describe en el apartado 6.1. de esta sección.

10.5. Extracción de RNA de suero y determinación de viremia

Se extrajo el RNA presente en 250 µl de suero de las muestras obtenidas de los animales de los tres grupos a partir del momento del desafío, empleando el reactivo *MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA viral se determinó mediante RT-qPCR a partir de un volumen equivalente a 1/200 del total extraído. Las reacciones de RT y PCR se realizaron en un único paso empleando el reactivo *AgPath-ID one-step RT-PCR kit* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un equipo *7500 Real Time PCR System* (Life Technologies). La reacción de RT se llevó a cabo en una primera etapa a 45°C durante 10 minutos y a continuación la retrotranscriptasa se inactivó durante 10 min a 95°C. La etapa final de amplificación se realizó utilizando los parámetros de termociclación: 95°C, 10 min; 95°C, 15 seg; 40 ciclos de 60°C, 1 min. Se empleó un ensayo TaqMan® específico para la secuencia del gen N del PRRSV-Olot91 descrita en la Tabla V. Los valores de Ct se usaron para estimar el título en pfu/ml por intrapolación en una recta patrón generada a partir de diluciones de una muestra del PRRSV-Olot91-like titulada en macrófagos alveolares porcinos y sometida a procesos de extracción, purificación y análisis idénticos a los que se sometieron las muestras de suero, que se realizaron por triplicado (Fig. 9).

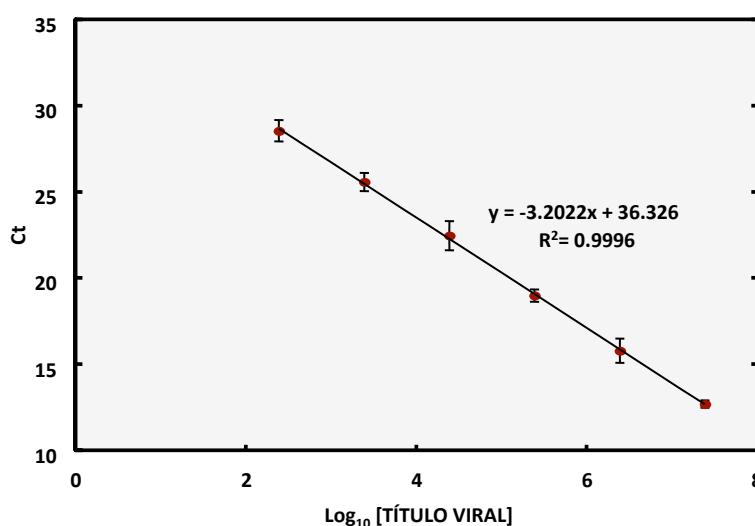


Figura 9. Recta patrón para la estimación del título del PRRSV virulento en suero. Equivalencia entre el título viral en medio libre de células y los valores del ciclo de corte (Ct). Un volumen final de 250 µl de diluciones de orden 10 de una muestra de PRRSV-Olot91-like titulada en macrófagos porcinos se extrajo empleando el reactivo *MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit* (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un volumen equivalente a 1/200 del total extraído se utilizó para cuantificación mediante RT-qPCR empleando una sonda TaqMan específica para la secuencia del gen N de PRRSV-Olot91 (Tabla V). Se obtuvo la media de los valores de Ct de tres diluciones independientes. Los valores de Ct obtenidos se representaron frente al título viral correspondiente a cada dilución, determinando una recta que se usó como recta patrón para la estimación del título viral en las muestras de suero. Las barras de error representan la desviación estándar.

10.6. Evaluación de citoquinas en suero de cerdo

Se cuantificaron los niveles de las proteínas interleuquina 1 β (IL-1 β), interleuquina 10 (IL-10), interferón alfa (IFN- α), interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 4 (IL-4) e interleuquina 8 (IL-8) presentes en las muestras de suero. Para ello se utilizó el reactivo *Swine Cytokine Magnetic 7-Plex Panel* (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis, se mezcló de forma aleatoria el mismo volumen de tres muestras correspondientes a animales del mismo grupo y extraídas el mismo día. Las lecturas se realizaron en un equipo *Luminex 100IS*, y los datos de concentración se calcularon con el programa *xPONENT* a partir de los valores de los estándares proporcionados por el fabricante, obteniéndose los siguientes límites mínimos de detección para cada citoquina analizada: IL-1 β (36.808 pg/ml), IL-10 (4.572 pg/ml), IFN- α (2.661 pg/ml), IFN- γ (0.342 pg/ml), TNF (146.86 pg/ml), IL-4 (0.548 pg/ml), IL-8 (0.786 pg/ml).

10.7. Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)

La presencia de anticuerpos específicos frente al TGEV, al PRRSV o las diferentes proteínas del PRRSV empleadas en la inoculación se evaluó mediante ELISA. Para ello, placas de ELISA de 96 pocillos *Maxisorp* (Nunc) se tapizaron con los virus TGEV (0.2 μ g/pocillo) o PRRSV (0.05 μ g/pocillo) parcialmente purificados, o con las proteínas del PRRSV GP3 (0.25 μ g/pocillo), GP4 (0.5 μ g/pocillo), GP5 (0.1 μ g/pocillo), M (0.1 μ g/pocillo) o N (0.2 μ g/pocillo), expresadas en células de insecto y purificadas como se indica en el apartado 9.1. de esta sección. Para ello, se incubaron con el antígeno correspondiente diluido en solución de lavado (0.1% BSA, 0.05% Tween-20 en PBS), durante 12 h a 4°C. Posteriormente, se bloquearon con BSA al 5% en PBS durante 2 h a 37°C y se incubaron con diluciones 1:20, 1:80 y 1:320 de los sueros en solución de lavado durante 90 min a 37°C. Después de lavar exhaustivamente los pocillos con solución de lavado, se incubaron con proteína A conjugada a peroxidasa (Sigma) diluida 1:40000 en solución de lavado durante 30 minutos a 37°C. Los anticuerpos unidos se detectaron con el reactivo *K-Blue MAX TBM Substrate* (Neogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la absorbancia a 450 nm (A_{450}) empleando un lector *Microplate Reader 680* (Bio-Rad) y el programa *Microplate Manager 5.2.1*. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron a partir de los valores obtenidos en cada placa para un suero control positivo, obtenido de

un cerdo 56 días después de la infección por el PRRSV, y un suero control negativo, obtenido de un cerdo no inmune para el PRRSV ni el TGEV, y se expresaron como el SP ratio [SP ratio= (A₄₅₀ suero problema- A₄₅₀ suero control negativo)/ (A₄₅₀ suero control positivo- A₄₅₀ suero control negativo)].

10.8. Evaluación de la capacidad de neutralización de los sueros

Células MARC-145 crecidas en placas de 12 pocillos (M12) hasta alcanzar un 100% de confluencia, se infectaron con una cantidad equivalente a 100 pfu del PRRSV-Olot91, incubado previamente durante 1 h a 37°C en ausencia o en presencia de diluciones seriadas (1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) de los sueros de cerdo descomplementados, realizadas en DMEM-5% FBS descomplementado hasta un volumen final de 100 µl. Después de un periodo de adsorción del virus de 1 h a 37°C, se retiró el medio que contenía el virus y el suero experimental y se añadió medio *overlay*. A las 72 hpi, las células se fijaron con formaldehído, se tiñeron con cristal violeta, y se contó el número de placas de lisis presente en cada caso. La capacidad de neutralización de cada muestra de suero se evaluó por duplicado, y se expresó a partir del número de placas obtenido en la dilución 1:16, dado que a esta dilución un suero control positivo, obtenido de un cerdo 56 días después de la infección por el PRRSV, condujo a un 98%- 100% de neutralización. Además, el valor se hizo relativo para cada experimento al valor de neutralización obtenido con un suero de cerdo control negativo procedente de un cerdo no inmune para el PRRSV [Índice de neutralización, %= 100%- (número de placas muestra suero/ número de placas en suero control negativo)x100]

10.9. Análisis histopatológico

Muestras representativas del pulmón de cerdos vacunados y desafiados, obtenidas 35 y 56 días después de la primera inmunización, se fijaron con PFA al 4% durante 48h y se almacenaron a 4°C en PBS. Las muestras se embebieron en parafina y se realizaron secciones de 4 µm de grosor cada 200 µm. El análisis histopatológico se basó en la observación de secciones teñidas con hematoxilina y eosina, realizadas por el servicio de histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, España). Las muestras se visualizaron con un microscopio ZEISS Aixophot, y las imágenes se tomaron y procesaron con el programa *NIS-Elements F2.20* (Nikon). El daño pulmonar se cuantificó analizando 50

campos microscópicos elegidos al azar por cada animal, y evaluando cada uno de ellos de 0 a 3 atendiendo al grado de inflamación intersticial, peribronquiolar y perivascular, de acuerdo a criterios previamente descritos (Page y col., 2012).

11. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL TGEV

Para verificar la secuencia de los virus rTGEV-WT y rTGEV-ZF-C, se obtuvo el cDNA de dos clones de cada virus como se indica en el apartado 6.2. de esta sección, y se amplificó mediante un conjunto de 36 PCRs (Tabla IX), de forma que los extremos de cada PCR solapaban entre sí al menos 200 bp. Se secuenciaron ambas cadenas del producto de PCR empleando los oligonucleótidos utilizados en la amplificación (Tabla IX). Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el *software* SeqMan del paquete DNASTAR Lasergene® (SeqMan® Version 8.0.2 DNASTAR. Madison, WI).

Tabla IX. Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación del genoma del TGEV

PCR	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN EXTREMO 5'
1	Ldrt	CGTGGCTATATCTCTCTTTTACTTTAACTAG	25
	g905_RS	CTCTAAAATAGTTCTGTCTGAAG	927
2	129_VS	AGGACAAGCGTTGATTATTTCC	129
	1888_RS	GGTGTCACATTAACAGTTGCACCAACCAAGC	1888
3	0460_VS	ATTGGTGTTCTTGGTAACGG	498
	genoma2_RS	ACTCATTGAATTTAGGCAGCAAAGC	2213
4	2.22_VS	CAGAGCTTTTAAGGACGAC	2222
	3.59_RS	ACAATTATTATCCCCTTGC	3593
5	fat7_VS	GTTGAATCTGTTGAAGAAG	3318
	rt-rep_RS	CTAGGCAACTGGTTTGTAAACATCTTT	4909
6	4.31_VS	CTTTTATCAGGGTGCTTTGG	4310
	5.90_RS	GACTTTAACTTTAGGCATC	5885
7	fat5_VS	AGTACTAGAAGCAACTGG	5483
	6.67_RS	ACGTACAATTTCTGTCACAG	6674
8	6kb_VS	CTGCAGTCTGTGGCAACTC	6121
	7.34_RS	AAGTGCAGCAAAATCCTGG	7340
9	fat4_VS	CTGTGACGAAATTGTACG	6656
	7.80_RS	CACGTCAGGAATTGGTCTC	7802
10	fat4_VS	CTGTGACGAAATTGTACG	6656
	8.15_RS	ATGCACTCTCCCACTCTAC	8155
11	7.68_VS	TAAAGGATTCGGTGACTGG	7682
	9.08_RS	AGCAATAACATGTCTAGGGC	9080

PCR	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN EXTREMO 5'
12	8603_VS	CCTAGTTTCTCTATGACTCACTCCC	8603
	10.03_RS	TCTTATGTTTGATGCCAGAG	10035
13	9.29_VS	GCTTGTTATGAAGGATGTC	9291
	11.17_RS	TGCTCAGCCATTTTGTCGAG	11179
14	10016_VS	CTCTGGCATCAAACATAAG	10016
	11.45_RS	ATAGTCCAAATAGCACCAGC	11452
15	11.02_VS	TTGCACTTGAAAAAGCTCGC	11023
	orf1a_12328_RS	CCCTTAGGCTTTGATCAACAGTAAACTCTGC	12328
16	fat8_VS	CATTCCAGCTGCATCAGC	11342
	12762_RS	GGGTACCAATTCTTCAGTGCAAGCACCTACTG	12762
17	tgev11568_VS	CAGAACAATGAAATTATGCCAGG	11568
	tgev12405_RS	CTACTAACATGGTCTGGATCAGTACC	12405
18	dic-2.03kb_VS	GCACACAAGATCCAATTTCGG	12380
	dic-7.3_RS	TAGCAGCTTCACCACCTGTG	13646
19	12195_VS	GGCATGCAAATACCAACTGGCACACAAGATCC	12195
	14.69_RS	CAAATTCTTCATCAATGCTGC	14522
20	DIC3_VS	AAGCAGTATGATTTACTAGC	13094
	DIC4.2_RS	GCTCTAGAGCGTTTGAATCAACCCCCAAAAGC	14416
21	hcv_orf1b-14.3_VS	GGAATTCCGGGACTATCCTAAGTGTG	14148
	16027_RS	TGGTACCGCATGAGAATGCAGTGTAGA	16032
22	orf1b_15.64_VS	CTTGCTAACAATGTCAAGG	15458
	17.363_RS	GTCTAACAATGTGCCAAGG	17363
23	nsp13fin_VS	CATGTGTGATAGAACTATGTATGAGAATCTTG	16822
	nsp15prin_RS	CCATTATTTTGTGTCAGCAATAACAGCAG	18545
24	N7MTasa_VS	GCTTGCTTCAAGTGTGCATTAGGATG	17561
	tgev_19183_RS	CGATATAAGAAGATGCATACC	19183
25	TGEV-18707_VS	GATTATGAAGCTGAACGTCC	18707
	TGEV_20221_RS	CTTGAATTTAGGAGTGTCTAGG	20221
26	TGEV-19802_VS	GATTGTACTAGTCTTTACATCG	19802
	S-250_RS	TAATCCCAATACAATGCTTT	20633
27	1b-316_VS	GTGTTAACACGTCATCATCA	20049
	S546_RS	GTAAATAAGCAACAACCTCATC	20932
28	ST-304_VS	CGGTAAACGTAGTCGTTAATGG	20668
	S-1170_RS	ACCGTGGTCCATCAGTTACG	21559
29	1078_VS	TCATTGAACACAACGGGTGG	21442
	S-3060_RS	CACCTAATGTTATACCACCT	23449
30	S-2560_VS	CCAGTGTCAATAGACTGTTC	22930
	S_3870_RS	CACTTACAGTTGCATTAACA	24259
31	S-3806_VS	TTTGACCCCCAGAATA	24159
	X2a-408_RS	TGCTGTTGTACTATAACACG	25260

PCR	OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN EXTREMO 5'
32	S-4310_VS	ATTACGAACCAATTGAAAAAGTGC	24680
	mRNAM_RS	GCATGCAATCACACACGCTAA	26160
33	3b-505_VS	TGTGAATGACCTCACGTTGC	25639
	N13_RS	CCCTGGTTGGCCATTAGAAAGTTTAG	26936
34	M-328_VS	TCCAGATATGTAATGTTTCGG	26449
	N-533_RS	TCTTGTTATTGAATTGTTGCCTGCC	27478
35	N-376_VS	ACGCTTGGTAGTCGTGGTGCTA	27298
	28497_RS	CTAGATCCAGACGTTAGCTCTTCCATTGTTGG	28534
36	TN-787_VS	GACCTCGTTGCCAATGGG	27709
	28543_RS	GTATCACTATCAAAAGGAAAATTTTCAAACAATTTTAC	28586

12. MODELADO DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

Las estructura de las proteínas nsp14 del TGEV y M del PRRSV se modeló *in silico* empleando el servidor web *RaptorX* (Kallberg y col., 2012). El modelado de la proteína M se realizó en dos dominios: el dominio N-terminal, incluyendo los dominios transmembrana se modeló en base a la proteína Cthe_2159 de *Clostridium thermocellum* con un p-valor de 2.75×10^{-3} , y el dominio C-terminal se modeló en base a la estructura de la proteína AcrB de *E. coli*, con un p-valor de 4.18×10^{-3} . En el modelado de la proteína nsp14 del TGEV se usó la proteína nsp14 del SARS-CoV como molde, con un p-valor de 2.5×10^{-35} . Para la visualización de los modelos generados se utilizó el paquete de software *USF Chimera* (Pettersen y col., 2004).

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media de los datos más la desviación estándar. Para analizar las diferencias en los valores medios entre los distintos grupos se utilizó el test de la *t de Student*, mientras que para analizar la significancia estadística entre porcentajes de grupos se utilizó el test de *Chi cuadrado*. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue inferior a 0.05, o 0.1 cuando se trató de experimentos con animales (Noymer, 2008).

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL PRRSV CON VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV

En esta tesis se ha utilizado el rTGEV para la expresión de proteínas del PRRSV, de interés en salud animal. El uso del TGEV como vector para combatir al PRRSV tiene varias ventajas. Una de ellas es su capacidad para presentar los antígenos en las mucosas, promoviendo la inmunidad secretora y sistémica. Una vacuna de este tipo podría proteger frente a dos virus patógenos del ganado porcino: el PRRSV y el TGEV. Como punto de partida, en el laboratorio se disponía de una primera generación de vectores basados en el genoma del TGEV que co-expresaban las proteínas GP5 y M del PRRSV, y variantes de glicosilación de la proteína GP5 junto a la proteína M (Cruz y col., 2010). La capacidad de estos vectores para inducir una respuesta protectora frente al PRRSV se evaluó *in vivo*, observándose que los animales inoculados con estos rTGEVs inducían una respuesta humoral específica frente al PRRSV más rápida y de mayor grado que la de los animales no vacunados (Cruz y col., 2010). Sin embargo, la protección conferida por estos vectores frente a la infección por el PRRSV no fue suficiente, lo cual probablemente se debió a la inestabilidad del vector basado en el genoma del rTGEV que expresaba la proteína GP5.

La expresión de otras proteínas del PRRSV, solas o combinadas, también fue tóxica, lo que resultaba en inestabilidad y pérdida del módulo de expresión heterólogo a lo largo de los pases en cultivos celulares. De hecho, la expresión de la proteína GP5 se perdió después de cuatro pases en cultivos celulares. La co-expresión del heterodímero GP5-M incrementó la estabilidad de la expresión de la proteína GP5, que se detectó hasta después de ocho pases en cultivos celulares (Enjuanes y col., 2007). En esta combinación antigénica, la proteína M se expresó desde el vector derivado del genoma del TGEV con alta estabilidad, detectándose en el 80% de las células infectadas después de 8 pases en cultivos celulares (Cruz y col., 2010). Otras combinaciones antigénicas ensayadas en el laboratorio incluían la expresión de la proteína GP3 y la co-expresión de las proteínas GP3 y GP5. Los vectores basados en el genoma del rTGEVs construidos que expresan estos antígenos se rescataron, pero la expresión de las proteínas heterólogas se perdía en tan solo dos pases en cultivos celulares, lo que indicó una gran toxicidad de la proteína GP3 clonada en los vectores basados en el rTGEV. La co-expresión de las proteínas GP2, GP3 y GP4 resultó imposible dado que no se rescataron virus infectivos a partir del cDNA que incluía los genes heterólogos.

1.1. Expresión de las proteínas GP4 y M del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV

La proteína GP4 del PRRSV contiene un epítipo inductor de anticuerpos neutralizantes (Costers y col., 2010; Vanhee y col., 2010), mientras que la proteína M de PRRSV se considera la principal inductora de la respuesta inmune celular en la infección (Bautista y col., 1999). Estas proteínas sólo se habían expresado con vectores basados en el genoma del rTGEV en módulos de expresión tricistrónicos o bicistrónicos, respectivamente, por lo que esta tesis se inició estudiando su expresión de forma independiente. Los genes que codifican las proteínas GP4 y M de la cepa PRRSV-Olot91 se clonaron en el cDNA infeccioso del TGEV bajo el control de la TRS del gen 3a y reemplazando los genes no esenciales 3a y 3b (Fig. 10A). Se eligió esta estrategia para la expresión de los antígenos heterólogos porque estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que esta posición en el genoma viral permitía la expresión estable de la GFP (Sola y col., 2003).

Los virus recombinantes rTGEV-TRS_{3a}-GP4 y rTGEV-TRS_{3a}-M se rescataron eficientemente a partir de los clones infecciosos correspondientes, con títulos próximos a 10^8 pfu/ml, similares a los obtenidos para un virus silvestre (rTGEV-WT). La expresión de los antígenos heterólogos se evaluó mediante inmunofluorescencia en células ST infectadas con cada uno de los recombinantes a moi 0.5. La infección a esta moi y el adelanto del análisis a las 8 hpi permitió evitar las reinfecciones, de forma que la estabilidad del vector se pudo estimar a partir del porcentaje de células infectadas que expresaron el antígeno heterólogo. La expresión de la proteína GP4 se detectó en un 94% de las células infectadas (Fig. 10B) y la proteína M en el 97% de las células infectadas (Fig. 10C) con el pase 2 de los virus, obteniéndose resultados similares para todos los clones virales analizados. Para analizar la estabilidad de los vectores anteriores, la expresión de cada una de las proteínas heterólogas se evaluó después de 8 pases seriados en cultivos celulares. La expresión de la proteína GP4 se perdió, detectándose en menos de un 5% de las células infectadas con el pase 8 del virus rTGEV-TRS_{3a}-GP4 (Fig. 10B). En cambio, la expresión de la proteína M se detectó en el 94% de las células infectadas con el pase 8 del virus rTGEV-TRS_{3a}-M (Fig. 10C). Es más, la expresión de la proteína M se mantuvo estable después de 16 pases en cultivos celulares, con el 96% de las células infectadas positivas para la expresión de esta proteína (Fig. 10C).

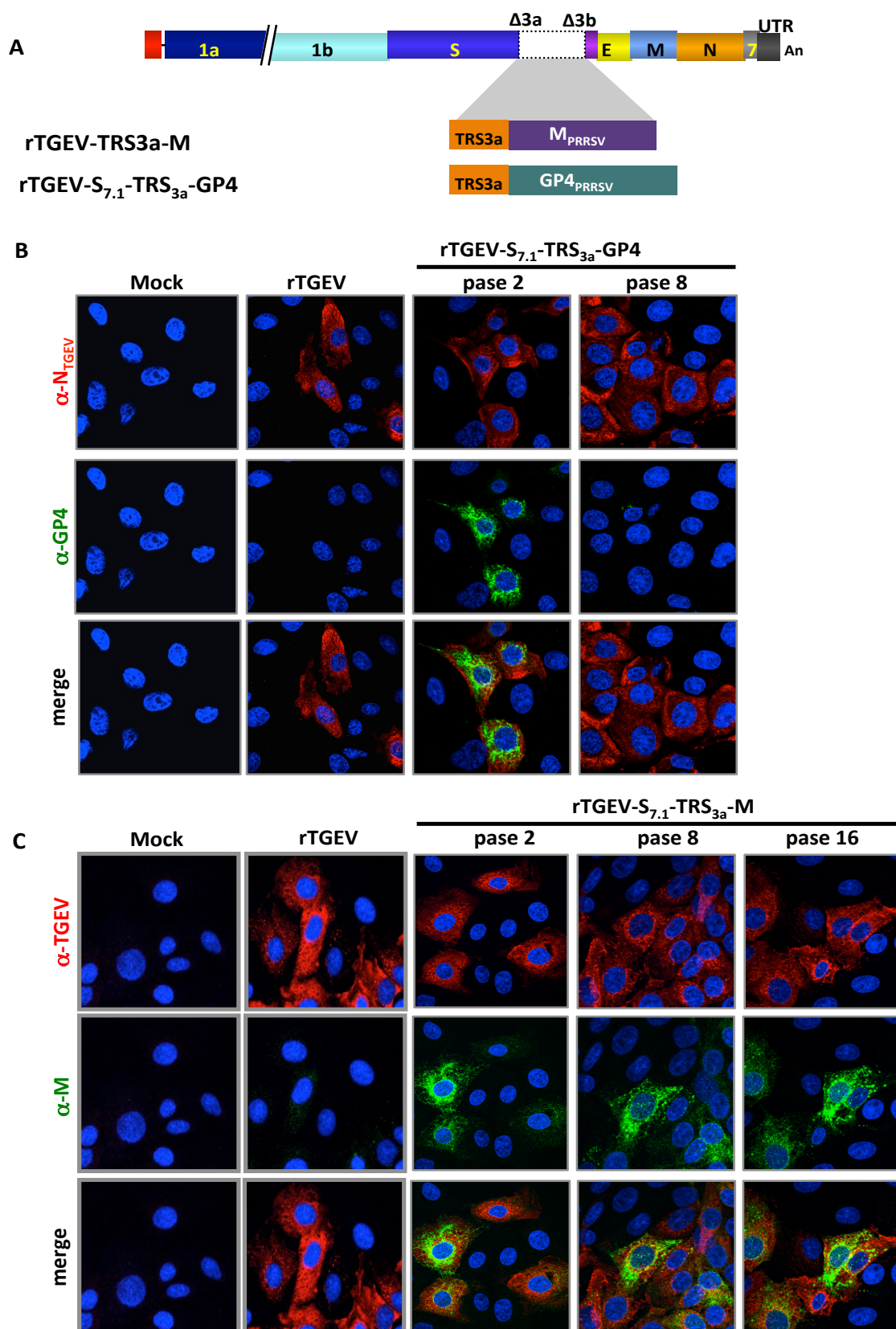


Figura 10. Expresión de las proteínas GP4 y M del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Esquema de la estructura del genoma de los vectores derivados del genoma del rTGEV que codifican las proteínas GP4 y M del PRRSV, rTGEV-TRS_{3a}-GP4 y rTGEV-TRS_{3a}-M. Se indica el *locus* en el que se introdujeron

los genes heterólogos. La eliminación de los genes 3a y 3b se muestra con un cuadro blanco. Análisis de la expresión de las proteínas GP4 **(B)** y M **(C)** del PRRSV mediante inmunofluorescencia. Monocapas de células ST no infectadas (Mock) o infectadas con los rTGEV-WT, o los pases indicados de los rTGEV-TRS_{3a}-GP4 y rTGEV-TRS_{3a}-M a moi 0.5 se fijaron 8 hpi. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para las proteínas GP4 y M del PRRSV (verde), junto con anticuerpos específicos para la proteína N del TGEV o para el TGEV (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). SP indica la superposición de los canales rojo, verde y azul.

Se estudió la estabilidad genética de los vectores a lo largo de los pases, analizando la presencia de las secuencias heterólogas introducidas y la expresión del sgRNA heterólogo correspondiente mediante RT-PCR y secuenciación. En el caso del virus rTGEV-TRS_{3a}-GP4, se observó la aparición de productos de un tamaño inferior al esperado al analizar el gRNA viral en la región genómica en la que se habían insertado los genes heterólogos (Fig. 11A). Estos productos eran resultantes de la pérdida de fragmentos génicos, e indicaron inestabilidad del vector. Asimismo, se generaron sgRNAs de un tamaño menor al esperado para el sgRNA correspondiente al gen codificante de la proteína GP4 (Fig. 11A). En ambos casos, no se detectó la amplificación de secuencias del tamaño esperado después de 8 pases (Fig. 11A). Por el contrario, y de acuerdo con los resultados de inmunofluorescencia, la estabilidad de los vectores que expresaban la proteína M fue total después de 8 y 16 pases en cultivos celulares (Fig. 11B). Esta estabilidad total se confirmó mediante el aislamiento de clones del virus rTGEV-TRS_{3a}-M después de 16 pases en cultivos celulares, y posterior análisis mediante RT-PCR y secuenciación de la región genómica en la que se había insertado el módulo de expresión heterólogo y el sgRNA del gen codificante de la proteína M. El 100% de los clones analizados contenían la secuencia del gen M después de 16 pases en cultivos celulares y expresaron el sgRNA correspondiente (Fig. 11C).

Es interesante remarcar la alta estabilidad de los vectores derivados del genoma del rTGEV que expresaron la proteína M del PRRSV, dado que esta proteína resulta altamente tóxica en otros sistemas de expresión, incluyendo bacterias y sistemas basados en células de insecto (Plana-Durán y col., 1997; Jeong y col., 2010). Además, la proteína M fue la primera proteína de un sistema viral heterólogo establemente expresada con vectores derivados del rTGEV.

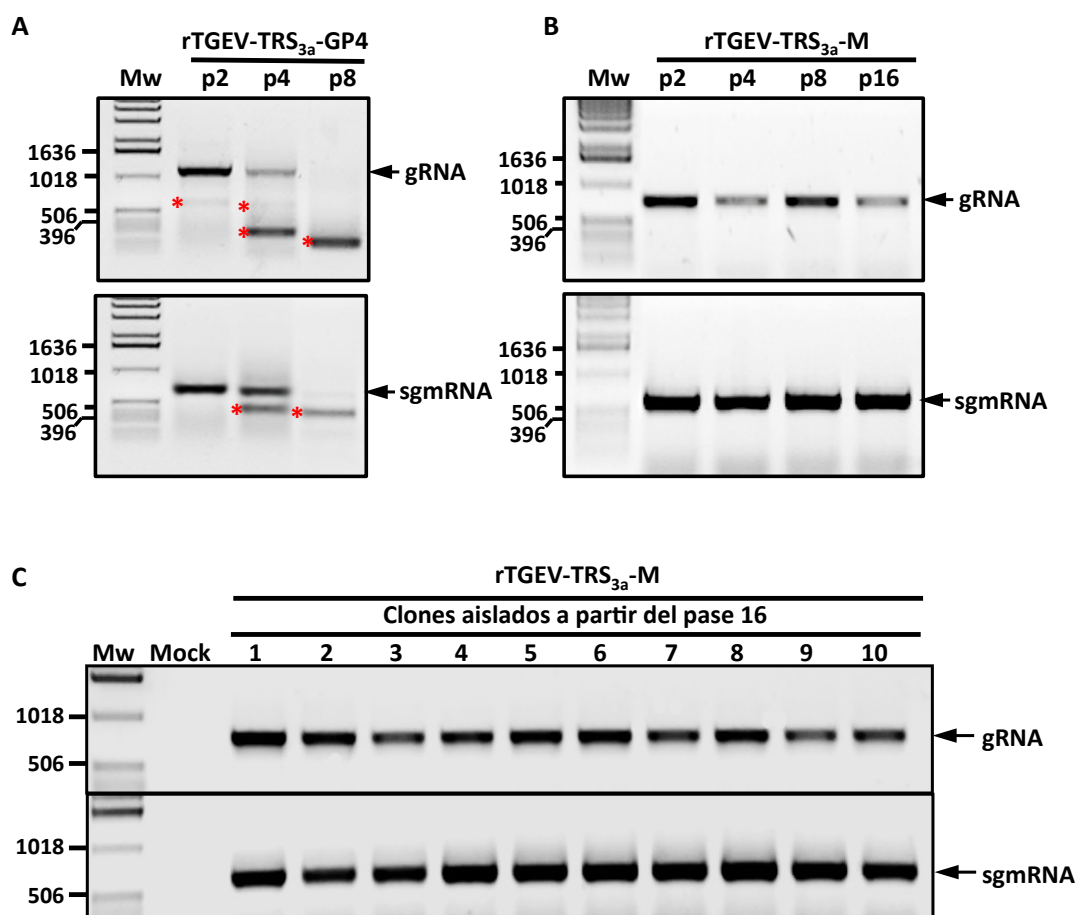


Figura 11. Estabilidad genética de los vectores basados en el genoma del rTGEV que codifican las proteínas GP4 y M del PRRSV. Análisis mediante RT-PCR de RNAs procedentes de células ST infectadas con los pases indicados de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-GP4 (**A**) y rTGEV-TRS_{3a}-M (**B**). (**C**) Análisis mediante RT-PCR de 10 clones aislados después de 16 pases en cultivos celulares del rTGEV-TRS_{3a}-M. Como control negativo se emplearon células no infectadas (Mock). En cada caso, se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el gen heterólogo (gRNA) y el mRNA del gen heterólogo (sgmRNA). Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases (bp), y la flecha indica el tamaño esperado del producto de PCR en cada caso. Las bandas de menor tamaño al esperado (indicadas mediante asteriscos rojos) corresponden a productos en los que se habían eliminado fragmentos del gen heterólogo.

2. AUMENTO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL PRRSV POR VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV

2.1. Aumento de los niveles de expresión de mRNA y proteína

En el desarrollo de vectores virales, la optimización de los niveles de expresión de los genes heterólogos es un aspecto importante. En nuestro laboratorio se han estudiado ampliamente los mecanismos moleculares implicados en el control de la transcripción en CoVs, y se han optimizado estrategias para aumentar la expresión génica, incluyendo el desarrollo de TRSs sintéticas y la manipulación de interacciones de RNA-RNA (Alonso y col.,

2002; Mateos-Gomez y col., 2011). Con el fin de estudiar el efecto de los niveles de expresión de un gen heterólogo en la estabilidad del vector, se empleó como modelo la proteína M del PRRSV que, como se ha mostrado anteriormente, se expresaba de forma estable con vectores basados en el genoma del rTGEV. Se generaron tres vectores adicionales para expresar la proteína M del PRRSV bajo el control de distintos mecanismos reguladores. Inicialmente se sustituyó la TRS_{3a} por una TRS sintética derivada del gen N (TRS_{22N}) (Alonso y col., 2002). Como segunda estrategia, se introdujo un motivo regulador de la transcripción optimizado (TRM^{opt}) diseñado a partir de una secuencia que regula la expresión del gen N del TGEV (Mateos-Gomez y col., 2011). Esta secuencia permite incrementar los niveles de mRNAs virales hasta 4 veces, a través de un mecanismo basado en la modificación de las interacciones RNA-RNA a larga distancia (Mateos-Gomez y col., 2011). Por último, se combinaron ambas estrategias (Fig. 12). Los virus recombinantes rTGEV-TRS_{22N}-M, rTGEV-TRM^{opt}-TRS_{3a}-M y rTGEV-TRM^{opt}-TRS_{22N}-M se rescataron eficientemente a partir de los respectivos cDNAs infectivos con títulos de 8.7×10^7 pfu/ml, 6.9×10^7 pfu/ml y 1.1×10^8 pfu/ml, respectivamente, similares a los del rTGEV-WT (9.3×10^7 pfu/ml).

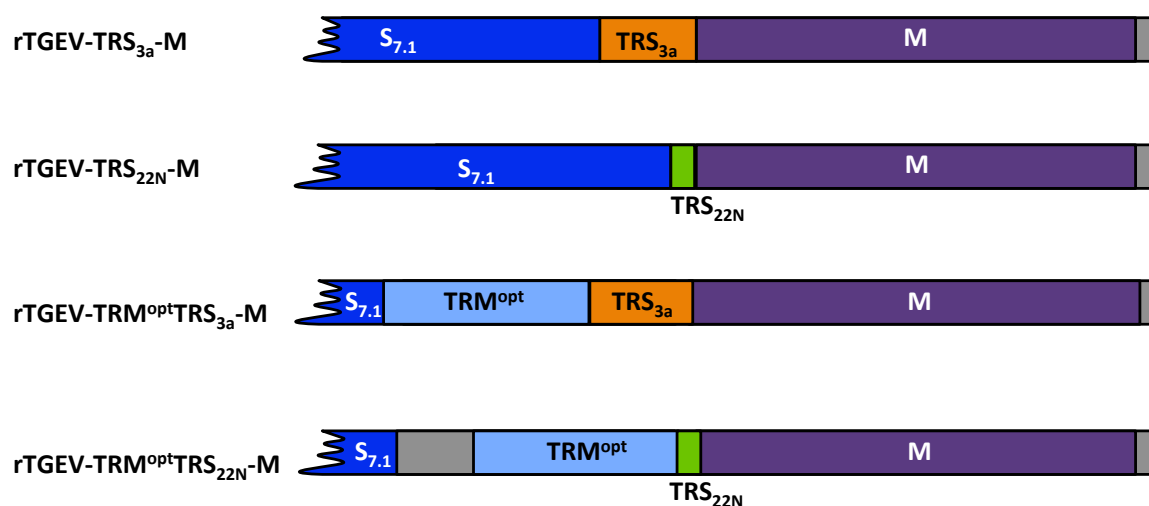


Figura 12. Diseño de módulos de expresión para aumentar los niveles de la proteína M del PRRSV. Esquema de las construcciones en las que la expresión de la proteína M del PRSSV se expresa bajo el control de diferentes mecanismos reguladores, las secuencias reguladoras de la transcripción TRS_{3a}, o la TRS_{22N}, y el motivo regulador de la transcripción optimizado (TRM^{opt}) junto a la TRS_{3a} o la TRS_{22N}.

Los niveles de expresión del gen heterólogo a partir de cada virus recombinante se analizaron midiendo la acumulación del sgRNA correspondiente a la proteína M del PRRSV (sgmRNA-M) mediante RT-qPCR. En todos los casos, las nuevas secuencias reguladoras de la transcripción aumentaron significativamente la acumulación del sgmRNA-M en relación a los niveles de expresión obtenidos a partir de la TRS_{3a}, que se tomó como valor de referencia (Fig. 13A). La variabilidad entre experimentos fue muy alta, especialmente en el último caso, lo que sugería que se estaban dando fenómenos de desestabilización de los vectores.

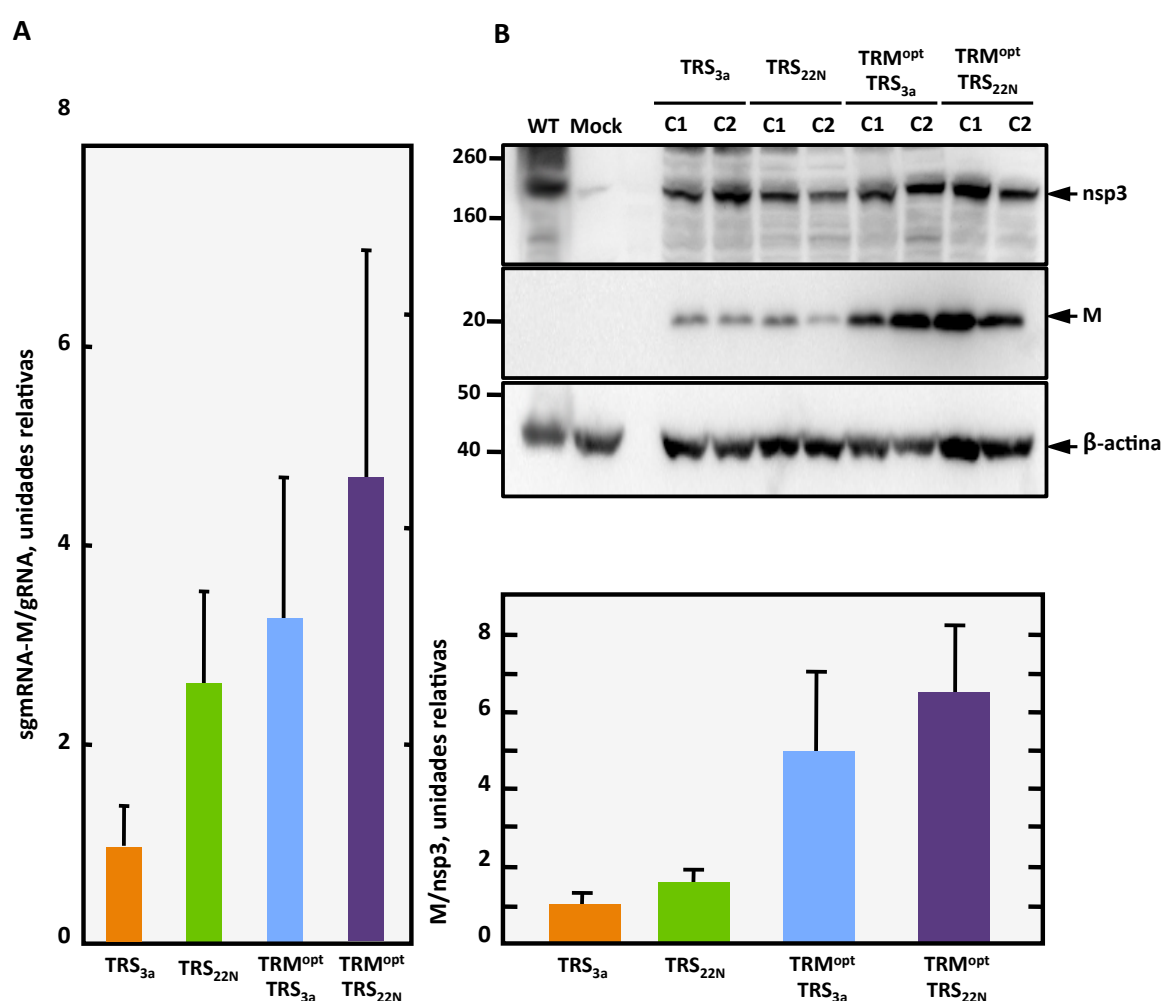


Figura 13. Expresión de la proteína M del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV bajo el control de distintos mecanismos reguladores. (A) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles del mRNA del gen M del PRRSV (sgmRNA-M) relativos al gRNA en células infectadas con los vectores rTGEV- TRS_{3a}-M, rTGEV- TRS_{22N}-M, rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{3a}-M o rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{22N}-M después de dos pases en cultivos celulares. Los niveles se hicieron relativos a los obtenidos a partir del vector rTGEV- TRS_{3a}-M, a los que se dio el valor 1. Se representa la media de cuatro infecciones independientes. Las barras de error representan la desviación

estándar. **(B)** Detección mediante *Western blot* de las proteínas nsp3 del TGEV (nsp3), M del PRRSV (M) y β actina como control de carga. Se extrajo proteína total de células no infectadas (Mock) o células infectadas con los vectores rTGEV-WT (WT), rTGEV- TRS_{3a}-M (TRS_{3a}), rTGEV-TRS_{22N}-M (TRS_{22N}), rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{3a}-M (TRM^{opt}-TRS_{3a}) o rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{22N}-M (TRM^{opt}-TRS_{22N}) después de dos pases en cultivos celulares. C1 y C2 representan dos clones diferentes de cada virus rTGEV. Los números a la izquierda indican la masa molecular en KDa. En el panel inferior se representan los niveles de expresión de la proteína M del PRRSV, relativos a los de la proteína nsp3 estimados mediante densitometría. Los niveles se hicieron relativos a los producidos por el vector rTGEV- TRS_{3a}-M, a los que se dio el valor 1. Se representa la media de cuatro infecciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar.

Para comprobar que el incremento en la transcripción del sgRNA-M se asociaba a un aumento en la cantidad de la proteína, la acumulación de la proteína M del PRRSV en células infectadas por cada uno de los virus recombinantes se analizó mediante *Western blot*. La cantidad de proteína M se hizo relativa a la cantidad de proteína nsp3 del TGEV, como indicador de la cantidad de proteína procedente de la replicación del vector. El recombinante rTGEV-TRS_{22N}-M acumuló 1.6 veces más proteína M que la producida por el virus de referencia, rTGEV-TRS_{3a}-M. Los niveles de proteína heteróloga aumentaron considerablemente cuando se empleó la secuencia TRM^{opt}, llegando a aumentos de 6.5 veces en el caso del virus rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{22N}-M (Fig. 13B).

2.2. Efecto del aumento de los niveles de expresión sobre la estabilidad del gen heterólogo

Para evaluar la estabilidad genética de los virus recombinantes con mayores niveles de expresión de la proteína M del PRRSV, se realizaron 16 pases seriados en cultivos celulares de dos clones de cada uno de los rTGEVs: rTGEV-TRS_{22N}-M, rTGEV-TRM^{opt}-TRS_{3a}-M y rTGEV-TRM^{opt}-TRS_{22N}-M. Se analizó mediante RT-PCR la presencia del sgRNA-M, correspondiente al gen que codifica la proteína M del PRRS, y de la región del gRNA en la que se introdujo el módulo de expresión heterólogo en los pases 2, 4, 8 y 16. A diferencia de lo que ocurría en el caso del rTGEV-TRS_{3a}-M, en el que la estabilidad a pase 16 fue total, en los mutantes con niveles aumentados de expresión se detectaron bandas de un tamaño inferior al esperado a partir del pase 8, siendo más evidentes en el pase 16 (Fig. 14A).

Se cuantificó la expresión del sgRNA-M mediante RT-qPCR. Como se esperaba, debido a la desestabilización observada a nivel genético, se observó una reducción en los niveles de expresión a lo largo de los pases (Fig. 14B). Estos datos indicaron que la estabilidad del inserto introducido en el vector disminuía al aumentar los niveles de expresión.

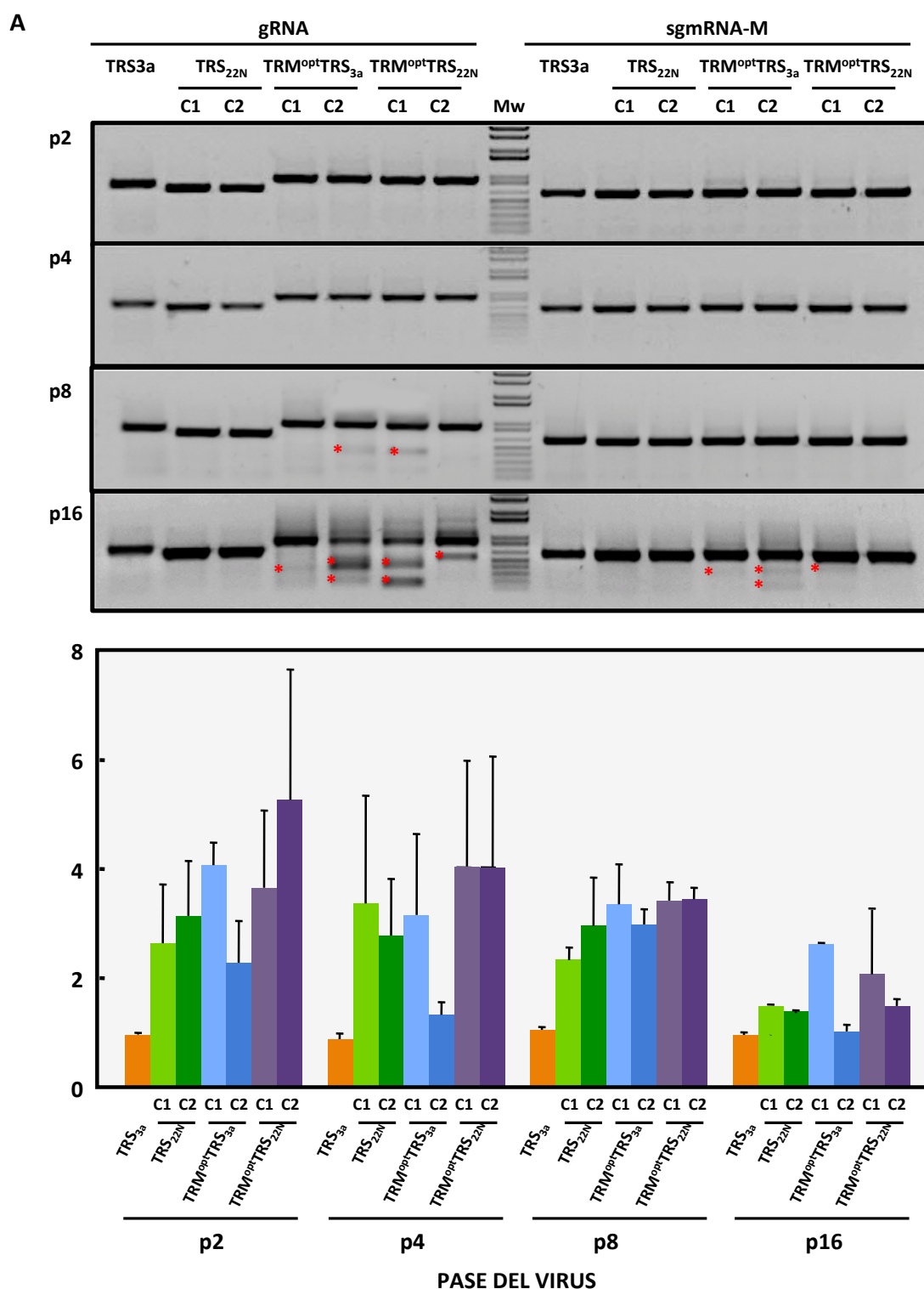


Figura 14. Estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV que controlan la expresión de la proteína M del PRRSV mediante distintas secuencias reguladoras de la transcripción. **(A)** Análisis mediante RT-PCR de los RNAs de células ST infectadas con los pases 2 (p2), 4 (p4), 8 (p8) y 16 (p16) de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-M (TRS_{3a}), rTGEV-TRS_{22N}-M (TRS_{22N}), rTGEV-TRM^{opt}-TRS_{3a}-M (TRM^{opt}-TRS_{3a}) o rTGEV-TRM^{opt}-TRS_{22N}-M (TRM^{opt}-TRS_{22N}). A la izquierda se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el gen heterólogo (gRNA) y, a la derecha, el mRNA del gen M del PRRSV (sgmRNA-M). C1 y C2 representan dos clones de cada vector, aislados a partir del pase 0, y pasados independientemente en cultivos celulares. Mw, marcadores de tamaño molecular. Las bandas de menor tamaño al esperado (indicadas mediante asteriscos rojos) corresponden a productos en los que se habían eliminado fragmentos

del gen heterólogo. **(B)** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles del mRNA del gen M del PRRSV (sgmRNA-M) relativos al gRNA en células infectadas con los pases 2 (p2), 4 (p4), 8 (p8) y 16 (p16) de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-M (TRS_{3a}), rTGEV-TRS_{22N}-M (TRS_{22N}), rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{3a}-M (TRM^{opt}-TRS_{3a}) o rTGEV- TRM^{opt}-TRS_{22N}-M (TRM^{opt}-TRS_{22N}). Los niveles se hicieron relativos a los obtenidos a partir del vector rTGEV- TRS_{3a}-M en pase 2, a los que se dio el valor 1. Se representa la media de cuatro infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

3. AUMENTO DE LA ESTABILIDAD DE LOS VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS DE PROTEÍNAS DEL PRRSV

3.1. Expresión del fragmento GP5ecto

Con el objetivo de eliminar los posibles dominios tóxicos de la proteína GP5 para el vector rTGEV, la expresión de la proteína GP5 se redujo a la del ectodominio de esta proteína (GP5ecto)(Fig. 15A), que de acuerdo a predicciones estructurales incluye los 68 aminoácidos N-terminales. En este dominio se localiza el epítipo crítico en neutralización (ECN) que es reconocido por los anticuerpos neutralizantes, así como los aminoácidos glicosilados y la cisteína que media la formación del heterodímero con la proteína M (Fig. 15A). Debido a la ausencia de anticuerpos para detectar la expresión del fragmento GP5ecto, este dominio se expresó fusionado a un epítipo de hemaglutinina (HA) en su extremo N-terminal (Fig. 15A). Como en casos anteriores, se diseñó un vector dicistrónico en el que la expresión del fragmento GP5ecto estaba controlada por la TRS_{3a}, y la co-expresión de la proteína M por la TRS sintética TRS_{22N} (Alonso y col., 2002). El virus recombinante se rescató eficientemente a partir del cDNA infectivo y la presencia del inserto heterólogo se confirmó mediante RT-PCR y secuenciación. La expresión del fragmento GP5ecto se analizó mediante inmunofluorescencia en pase 4 del virus, observándose que un 93% de las células infectadas expresaban la proteína GP5ecto (Fig. 15B). La estabilidad genética de este vector se evaluó y se comparó con la del rTGEV que co-expresaba la proteína GP5 completa (GP5_{FL}) junto con la proteína M del PRRSV. Para ello, la presencia de las secuencias heterólogas en el gRNA en 10 clones aislados después de 8 pases seriados en cultivos celulares se estudió mediante RT-PCR y secuenciación (Fig. 15C). Un 80% de los clones obtenidos a partir del pase 8 del rTGEV-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M conservaron el inserto introducido, en comparación con el 60% de los clones obtenidos a partir del mismo pase del rTGEV-TRS_{3a}-GP5_{FL}-TRS_{22N}-M, lo que representaba un ligero aumento de la estabilidad (Fig. 15C).

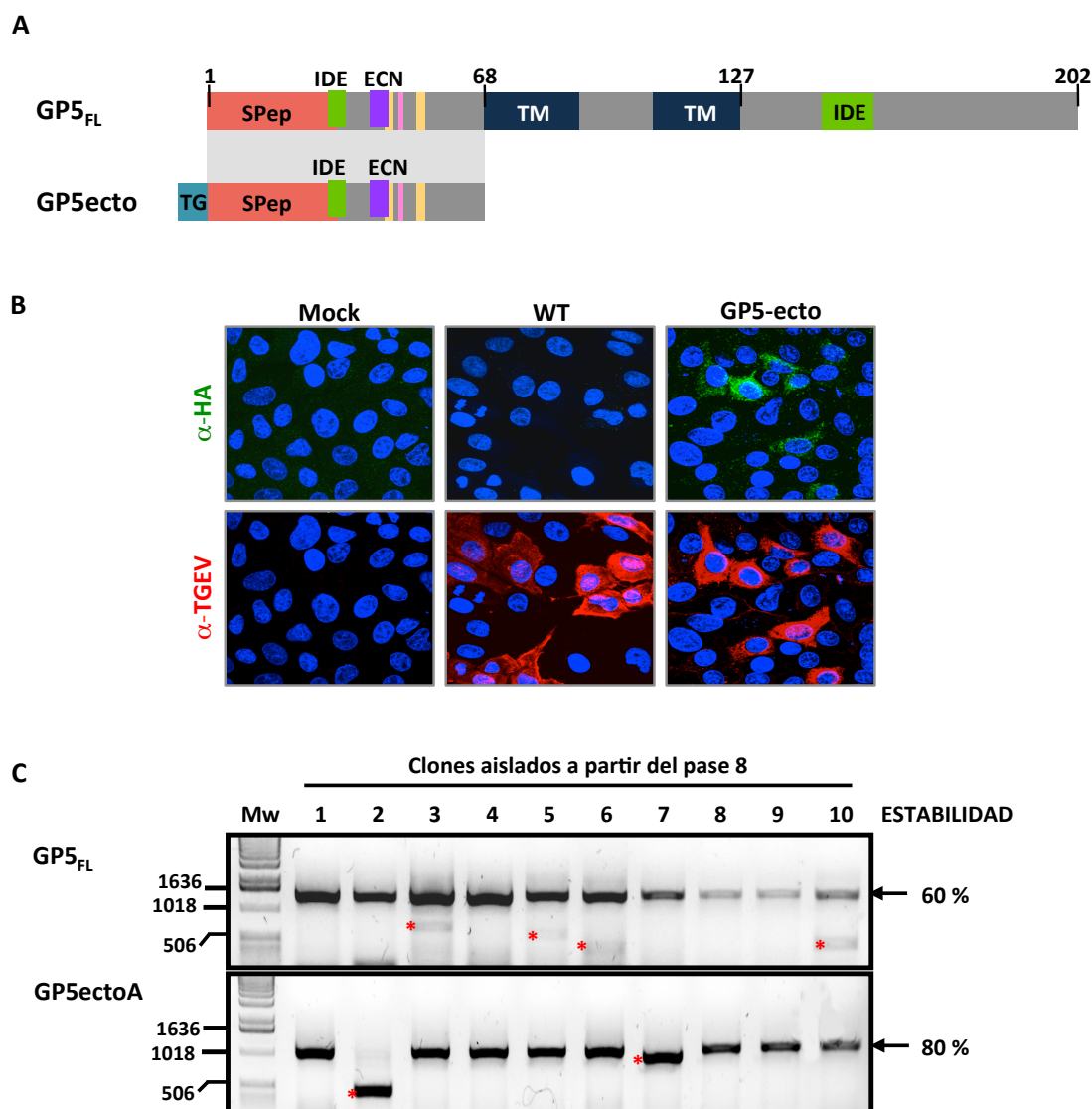


Figura 15. Expresión del fragmento GP5ecto de la proteína GP5 del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Esquema de la proteína GP5 del PRRSV (GP5_{FL}) y de la construcción GP5ecto. Se indican el péptido señal (SPep, rojo), los dominos transmembrana (TM, azul), los epítomos inmunodominantes (IDE, verde), el epítomo reconocido por los anticuerpos neutralizantes (ECN, violeta), los sitios de N-glicosilación (amarillo) y la cisteína implicada en la formación del heterodímero GP5-M (rosa). Los fragmentos GP5ectoA y GP5ectoB incluyen un epítomo de hemaglutinina (TG) en los extremos N- y C-terminal, respectivamente. Los números en la parte superior indican la posición en aminoácidos en la secuencia de la proteína. **(B)** Análisis de la expresión del fragmento GP5ectoA mediante inmunofluorescencia. Monocapas de células ST no infectadas (Mock) o infectadas a moi 0.5 con el rTGEV-WT o el rTGEV-TRS_{3a}-GP5ectoA-TRS_{22N}-M (GP5ectoA) se fijaron 8 hpi. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para el epítomo HA (verde) y para el TGEV (rojo). **(C)** Análisis mediante RT-PCR de diez clones de los rTGEV-TRS_{3a}-GP5_{FL}-TRS_{22N}-M (GP5_{FL}), rTGEV-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M (GP5ectoA) aislados después de 8 pases en cultivos celulares. Se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el módulo de expresión heterólogo. Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases, y la flecha a la derecha señala la altura para el tamaño esperado del producto de PCR en cada caso. Las bandas de menor tamaño al esperado (indicadas mediante asteriscos rojos) corresponden a productos en los que se habían eliminado fragmentos del gen heterólogo. Los porcentajes a la derecha indican la proporción de clones que fueron estables en cada caso.

3.2. Análisis de las secuencias heterólogas eliminadas en los rTGEVs después de los pases

Para analizar si la inestabilidad observada en los vectores se producía por la eliminación de fragmentos concretos del inserto o si ocurría al azar, se secuenciaron los productos generados en varios clones en los que se había observado inestabilidad genética (Fig. 16). No se observó un patrón concreto en la eliminación de regiones del gRNA, sino que variaba desde la eliminación de pequeños fragmentos correspondientes a la TRS que regulaba la expresión del fragmento de la proteína GP5, a delecciones que cubrían la totalidad de la secuencia correspondiente al gen de la GP5, e incluso afectaba a parte del gen correspondiente a la proteína M (Fig. 16). Estos datos sugerían que el proceso de recombinación responsable de la inestabilidad genética no ocurría en secuencias concretas sino que era un proceso estocástico.

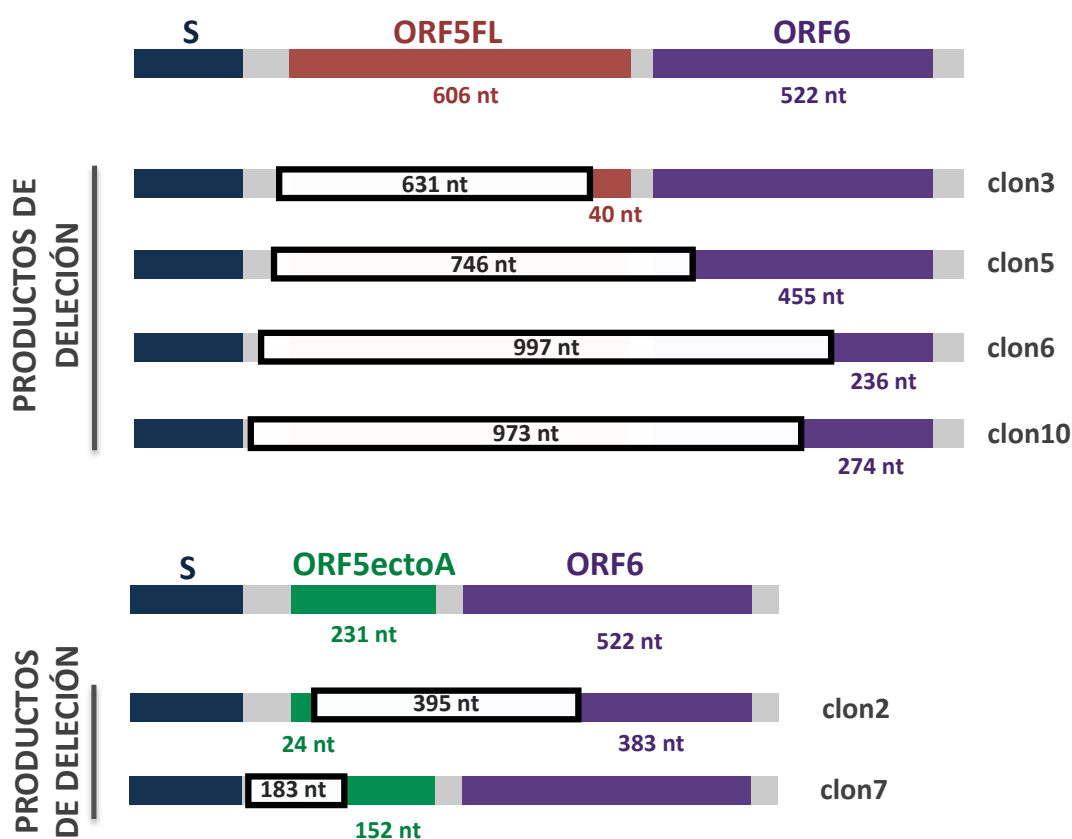


Figura 16. Análisis de los clones inestables aislados en el pase 8. En la parte superior de cada bloque se muestra un esquema de los módulos de expresión heterólogos en los vectores rTGEV-TRS_{3a}-GP5_{FL}-TRS_{22N}-M y rTGEV-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M. La eliminación de fragmentos de la secuencia heteróloga en los clones aislados a partir de pase 8 (Fig. 15) se indica con un recuadro blanco. Los números en la parte inferior de los recuadros de color indican los nucleótidos (nt) presentes en cada gen, mientras que los números dentro de los recuadros blancos indican el número de nucleótidos eliminados.

3.3. Expresión del fragmento GP5fr

Siguiendo la estrategia de reducción del tamaño del inserto heterólogo con el objetivo de eliminar posibles dominios tóxicos, un fragmento de 34 aminoácidos de la proteína GP5 (GP5fr) se expresó con el rTGEV (Fig. 17A). Este fragmento era equivalente al fragmento GP5ecto sin el fragmento transmembrana localizado en el extremo 5' que podría actuar como péptido señal. La eliminación de esta secuencia llevaba asociada la eliminación de un epítipo inmunodominante que, según se ha descrito para el genotipo 2 del PRRSV, actuaría como señuelo para el sistema inmune (Ostrowski y col., 2002). A este fragmento se le fusionó un epítipo FLAG en el extremo 3' para facilitar su detección (Fig. 17A). La secuencia del fragmento GP5fr se clonó en el cDNA infeccioso del rTGEV, construyendo un vector bicistrónico en el que se expresaban el fragmento GP5fr bajo el control de la TRS_{3a} y la proteína M del PRRSV bajo el control de la TRS_{22N}. El virus rTGEV-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M se rescató con un título de 6.7×10^7 pfu/ml, similar al del virus parental rTGEV-WT (8.4×10^7 pfu/ml).

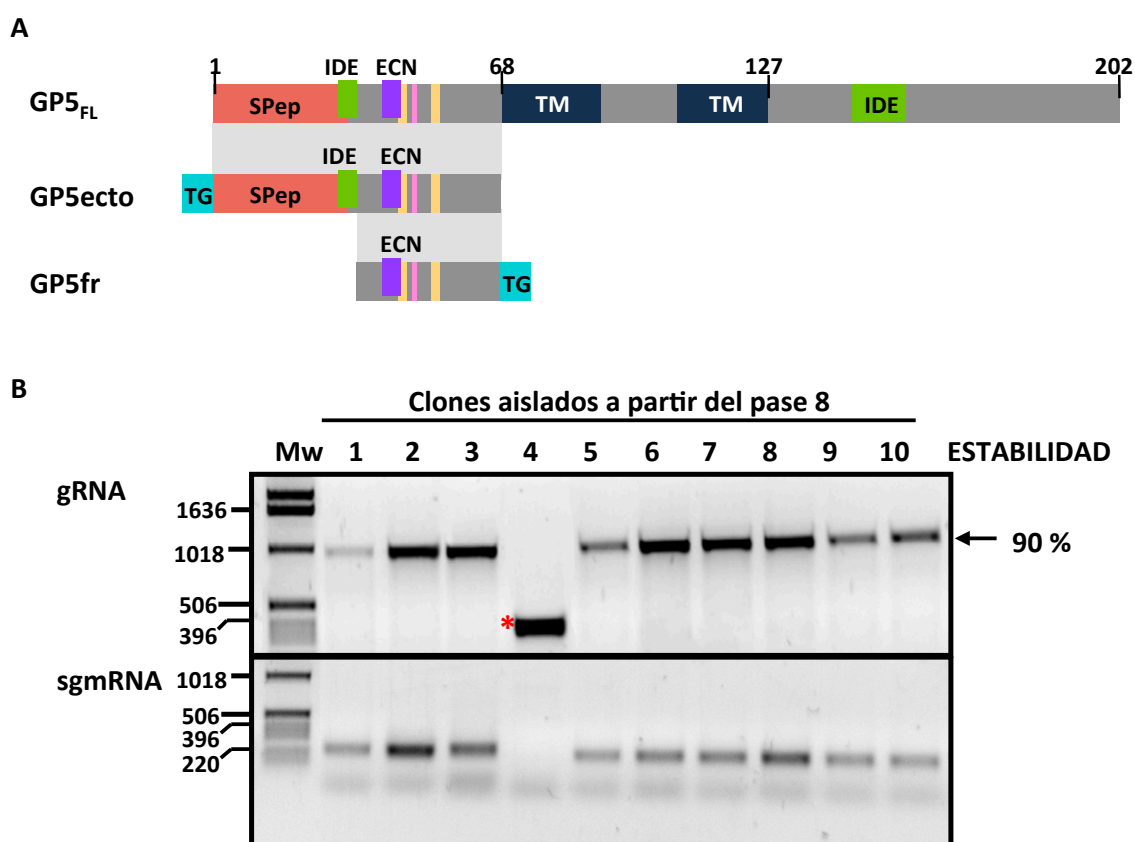


Figura 17. Expresión del fragmento GP5fr de la proteína GP5 del PRRSV con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Esquema de la proteína GP5 del PRRSV (GP5_{FL}) y de las construcciones GP5ecto y GP5fr. Se

indican el péptido señal (SPep, rojo), los dominos transmembrana (TM, azul), los epítomos inmunodominantes (IDE, verde), el epítomo reconocido por los anticuerpos neutralizantes (ECN, violeta), los sitios de N-glicosilación (amarillo) y la cisteína implicada en la formación del heterodímero GP5-M (rosa). Los fragmentos GP5ectoA y GP5fr incluyen, respectivamente, un epítomo de hemaglutinina o FLAG (TG) en los extremos N- y C- terminales. Los números en la parte superior indican la posición en aminoácidos en la secuencia de la proteína. **(B)** Análisis mediante RT-PCR de diez clones aislados del rTGEV-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M (GP5fr) después de 8 pases en cultivos celulares. Se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el módulo de expresión heterólogo (gRNA) y el sgRNA correspondiente al GP5fr (sgmRNA). Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases, y la flecha a la derecha indica el la altura para el tamaño esperado del producto de PCR en cada caso. La banda de menor tamaño al esperado (indicada mediante un asterisco rojo) corresponde a productos en los que se habían eliminado fragmentos del gen heterólogo. El porcentaje a la derecha indica la proporción de clones que fueron estables.

La estabilidad genética del vector rTGEV-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M se evaluó mediante el análisis por RT-PCR y secuenciación de la región del gRNA en la que se introdujo el módulo de expresión heterólogo, en clones aislados después de 8 pases seriados en cultivos celulares. Un 90% de los clones analizados mantenían la secuencia heteróloga introducida, lo que representó un aumento adicional en la estabilidad con respecto a la construcción GP5ectoA (Fig. 17B). Asimismo, se observó la expresión del sgRNA en estos clones (Fig. 17B), lo que indicó la expresión del gen heterólogo. Para analizar si este aumento de la estabilidad se mantenía a más largo plazo, se realizaron 8 pases adicionales en cultivos celulares de cada uno de los recombinantes que co-expresaban fragmentos de la proteína GP5 junto a la proteína M del PRRSV. La estabilidad se estimó del modo descrito anteriormente en clones aislados después de 16 pases. El análisis de 10 clones de cada construcción mostró que un 50% de los clones analizados del virus rTGEV-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M mantenían el módulo de expresión heterólogo (Fig. 18). Por el contrario, en el caso de los recombinantes que expresaban el gen completo (rTGEV-TRS_{3a}-GP5_{FL}-TRS_{22N}-M) o el fragmento GP5ecto (rTGEV-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M), ninguno de los clones analizados mantenía la secuencia heteróloga (Fig. 18). Estos datos indicaron un aumento significativo de la estabilidad a largo plazo de los vectores que expresaban el fragmento más pequeño de la proteína GP5 (GP5fr).

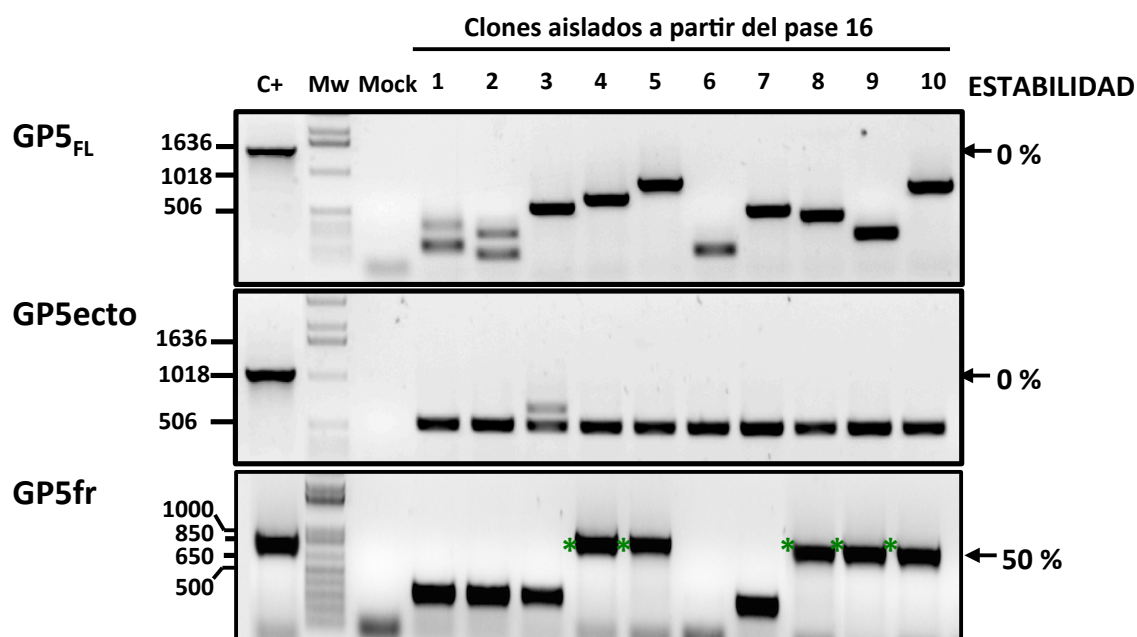


Figura 18. Estabilidad genética a largo plazo de los vectores basados en el genoma del rTGEV que codifican fragmentos de la proteína GP5 del PRRSV. Análisis mediante RT-PCR de diez clones aislados de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-GP5_{FL}-TRS_{22N}-M (GP5_{FL}), rTGEV-TRS_{3a}-GP5ecto-TRS_{22N}-M (GP5ecto) y rTGEV-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M (GP5fr) después de 16 pases en cultivos celulares. Se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el módulo de expresión heterólogo. En cada panel se incluye además un carril proveniente de células no infectadas (Mock), y un control positivo (C+), de células infectadas con el pase 0 del vector correspondiente. Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases, y la flecha a la derecha indica la altura para el tamaño esperado del producto de PCR en cada caso. Las bandas del tamaño esperado se indican mediante asteriscos verdes. El porcentaje a la derecha indica la proporción de clones que fueron estables en cada caso.

3.4. Expresión de los fragmentos GP3fr y GP4fr

La estrategia de expresión de pequeños dominios de la proteína GP5 del PRRSV permitió aumentar significativamente la estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV con respecto a la expresión de la proteína completa. La misma estrategia de expresión de pequeños dominios inmunológicamente relevantes se aplicó a las proteínas GP3 y GP4 del PRRSV, ambas tóxicas cuando se expresaban con el vector derivado del rTGEV. Se han identificado epítomos lineales reconocidos por anticuerpos neutralizantes en las proteínas GP3 y GP4 del PRRSV (Costers y col., 2010; Vanhee y col., 2011), lo que permitió el diseño de estructuras antigénicas que contenían estos epítomos fusionados al péptido señal de la proteína correspondiente (Fig. 19A). Los virus rTGEV-TRS_{3a}-GP3fr y rTGEV-TRS_{3a}-GP4fr se rescataron eficientemente a partir de los clones infectivos correspondientes, con títulos de

1.2×10^8 pfu/ml y 1.5×10^8 pfu/ml, respectivamente, similares al de virus parental rTGEV-WT (8.7×10^8 pfu/ml).

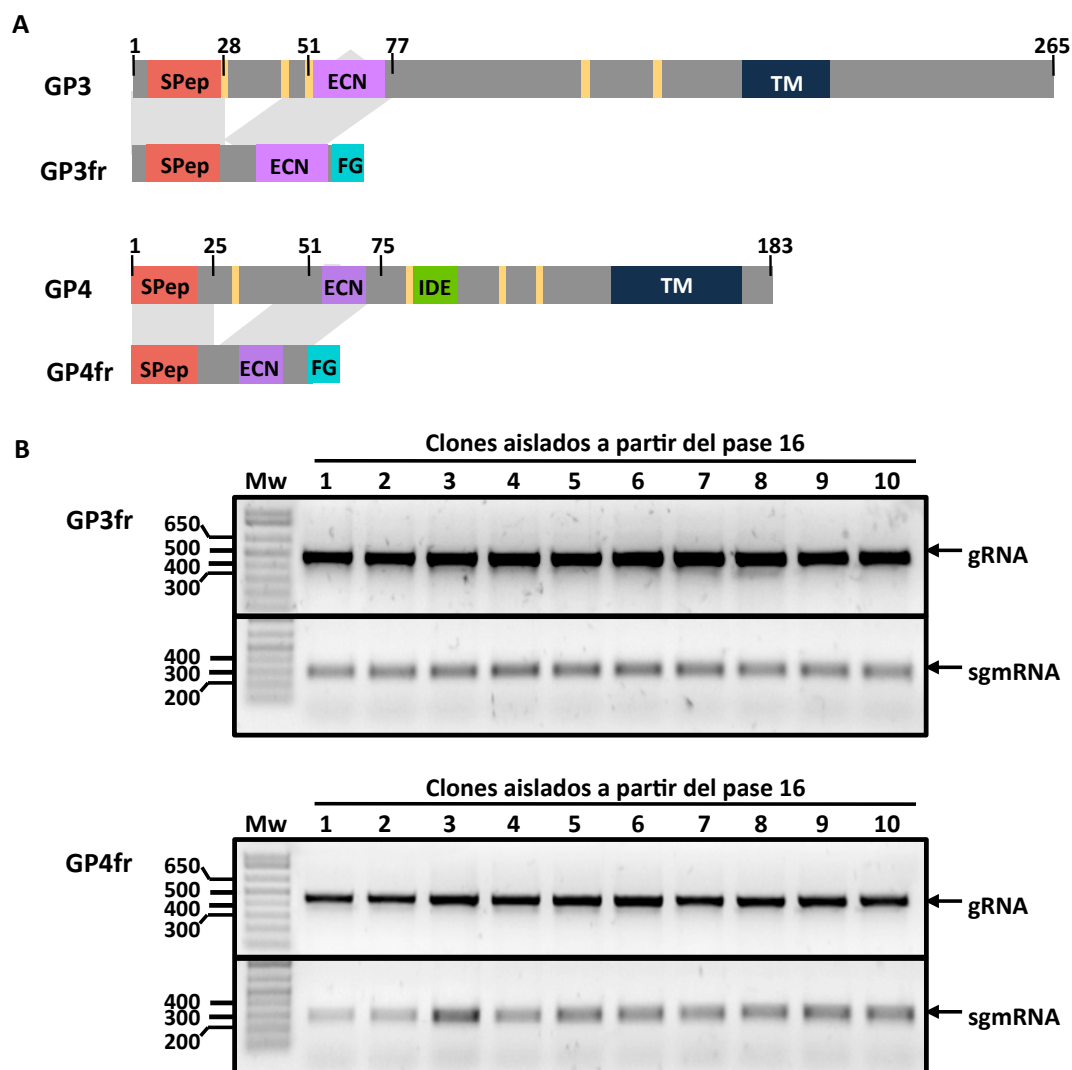


Figura 19. Expresión de los fragmentos GP3fr y GP4fr con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Esquema de las proteínas GP3 y GP4 y de los fragmentos GP3fr y GP4fr. Se indican en cada caso el péptido señal (SPep, rojo), los dominos transmembrana (TM, azul), el epítipo inmunodominante (IDE, verde), el epítipo reconocido por los anticuerpos neutralizantes (ECN, violeta) y los sitios de N-glicosilación (amarillo). Los fragmentos GP3fr y GP4fr se fusionaron con un epítipo FLAG (FG) en su extremo C-terminal. Los números en la parte superior indican la posición en aminoácidos en la secuencia de la proteína. **(B)** Análisis mediante RT-PCR de diez clones aislados de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-GP3fr (GP3fr) y rTGEV-TRS_{3a}-GP4fr (GP4fr) después de 16 pases en cultivos celulares. Se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el módulo de expresión heterólogo (gRNA) y el sgRNA correspondiente al fragmento (sgmRNA). Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en bp, y la flecha a la derecha indica la altura para el tamaño esperado del producto de PCR en cada caso.

El estudio de la estabilidad genética de estos vectores, mediante el análisis del tamaño y secuenciación de la región genómica correspondiente a las secuencias heterólogas, mostró que el 100% de los clones aislados después de 16 pases en cultivos celulares conservaban la secuencia heteróloga introducida (Fig. 19B). Asimismo, en todos los clones se observó la expresión del sgRNA correspondiente (Fig. 19B). Estos datos indicaron que la expresión de los fragmentos GP3fr y GP4fr con el vector basado en el genoma del rTGEV era totalmente estable, reforzando fuertemente la hipótesis de que una reducción en el tamaño del gen heterólogo expresado con el rTGEV conducía a un aumento en la estabilidad de su expresión.

3.5. Expresión de dominios de proteínas del virus de la peste porcina clásica (CSFV) con vectores basados en el genoma del rTGEV

Se analizó si la estrategia de expresión de pequeños dominios era válida para conseguir la estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV, independientemente de la naturaleza del gen heterólogo. Para ello, se utilizó como expresión de dominios de la proteína E2 del CSFV cuya expresión resultaba tóxica para el rTGEV (datos no mostrados). La peste porcina clásica es una enfermedad muy contagiosa que afecta al ganado porcino, causada por un virus RNA perteneciente a la familia *Flaviviridae*, y género *Pestivirus* (Moennig y col., 2003). La glicoproteína E2 de la envuelta del CSFV induce anticuerpos neutralizantes e inmunidad protectora frente a la infección viral. Se ha descrito que la proteína E2 contiene dos dominios estructuralmente independientes, denominados A y BC, y cada uno de ellos induce una respuesta inmune neutralizante que protege a los cerdos frente a la infección por el CSFV (van Rijn y col., 1996). Para la expresión de estos dominios con vectores basados en el genoma del rTGEV, se diseñaron dos estructuras antigénicas que consistían en los dominios A y BC de la proteína E2, respectivamente, fusionados al péptido señal de dicha proteína (Fig. 20A). Los virus rTGEV-TRS_{3a}-E2-A y rTGEV-TRS_{3a}-E2-BC se rescataron eficientemente a partir de los clones infectivos correspondientes, con títulos de 9.5×10^7 pfu/ml y 4.2×10^7 pfu/ml, similares al de virus parental rTGEV-WT (6.3×10^7 pfu/ml). La estabilidad genética de estos vectores se estudió mediante el análisis del tamaño y secuenciación de la región genómica correspondiente a las secuencias heterólogas en clones aislados de cada uno de los vectores después de 16 pases en cultivos celulares. El 100% de los clones aislados después de 16 pases en cultivos celulares

conservaron la secuencia heteróloga introducida (Fig. 20B). Asimismo, en todos los clones se observó la expresión del sgmRNA correspondiente (Fig. 20B). Es más, la expresión del fragmento E2-A se detectó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal específico para este dominio (Fig. 20C). Estos datos estaban de acuerdo con los mostrados anteriormente para la expresión de dominios de pequeño tamaño de las proteínas del PRRSV, reforzando la hipótesis de que la expresión de dominios de pequeño tamaño mejora la estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV.

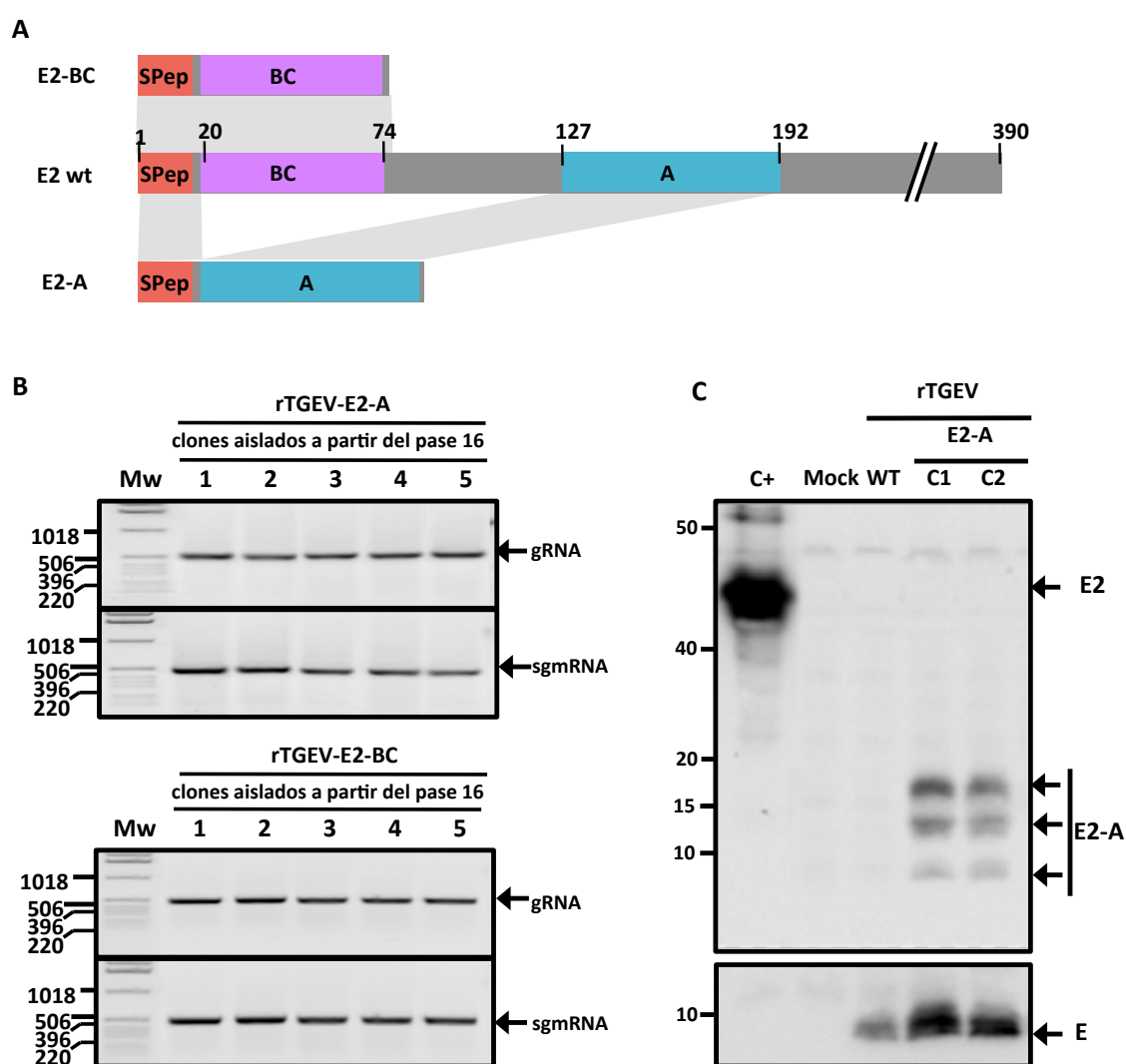


Figura 20. Expresión de los fragmentos E2-A y E2-BC con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Esquema de la proteína E2 del CSFV y de los fragmentos E2-A y E2-BC. Se indican el péptido señal (SPep, rojo) y los dominios inductores de anticuerpos neutralizantes A (azul) y BC (violeta). Los números en la parte superior indican la posición en aminoácidos en la secuencia de la proteína. **(B)** Análisis mediante RT-PCR de 5

clones aislados de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-E2-A y rTGEV-TRS_{3a}-E2-BC después de 16 pases en cultivos celulares. Se muestra la amplificación de una región de RNA genómico que incluye el módulo de expresión heterólogo (gRNA) y el mRNA correspondiente (sgmRNA). Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases, y la flecha indica el tamaño esperado en cada caso. **(C)** Detección mediante *Western blot* de las proteínas E2 del CSFV y el fragmento E2-A, y la proteína E del TGEV (E) como control de la infección viral. Se extrajo proteína total de células infectas con el vector rTGEV-TRS_{3a}-E2-A (E2-A) después de 16 pases en cultivos celulares. C1 y C2 representan dos clones diferentes pasados de manera independiente. Como controles se incluye un extracto de proteínas de células PK15 infectadas con el CSFV (C+) (amablemente cedido por Paloma Fernández Pacheco, CISA-INIA), un extracto de células ST no infectadas (Mock) y un extracto de células infectadas con el vector rTGEV-WT (WT). Los números a la izquierda indican la masa molecular en KDa.

4. EXPRESIÓN DE DOMINIOS ANTIGÉNICOS DEL PRRSV UTILIZANDO LA PROTEÍNA M DEL PRRSV COMO MATRIZ

La proteína M del PRRSV es la proteína estructural más conservada entre las diferentes cepas del PRRSV (Kapur y col., 1996; Murtaugh y col., 1998), y es la principal responsable de la inducción de una respuesta inmune celular (Bautista y col., 1999). La estructura de la proteína M de la cepa PRRSV-Olot91 se modeló empleando un *software* de predicción de estructura (Fig. 21A). En el modelo resultante se diferenciaron 3 hélices alfa, correspondientes a las tres regiones transmembrana descritas, junto a un corto dominio N-terminal y una región C-terminal más larga. Durante el desarrollo de esta tesis se ha mostrado que la proteína M se expresó de forma estable con vectores basados en el genoma del rTGEV. Además, se ha mostrado que dominios proteicos de pequeño tamaño se expresaron de forma muy estable con vectores derivados del rTGEV, sugiriendo que la expresión de dominios antigénicos de pequeño tamaño prevenía los problemas de toxicidad observados en la expresión de proteínas completas. Una nueva estrategia para la expresión de dominios antigénicos de forma estable fue la generación de proteínas quiméricas en las que la proteína M del PRRSV servía como matriz para exponer dominios antigénicos correspondientes a otras proteínas heterólogas.

4.1. Diseño de proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop y expresión con vectores basados en el genoma del rTGEV

Para comprobar si la utilización de la proteína M del PRRSV como matriz para la expresión de dominios antigénicos de otras proteínas permitía la expresión estable de los mismos con vectores basados en el genoma del rTGEV, se diseñaron dos proteínas quiméricas. En estas estructuras quiméricas, el epítipo de la proteína GP3 reconocido por

anticuerpos neutralizantes se insertaba en dos localizaciones que, de acuerdo al modelo estructural, se encontraban expuestas en la estructura de la proteína M: el extremo N-terminal, y un dominio desestructurado (*loop*) comprendido entre el segundo y tercer fragmento transmembrana (aminoácidos 63 a 70). Estas proteínas quiméricas se llamaron GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop, respectivamente (Fig. 21A).

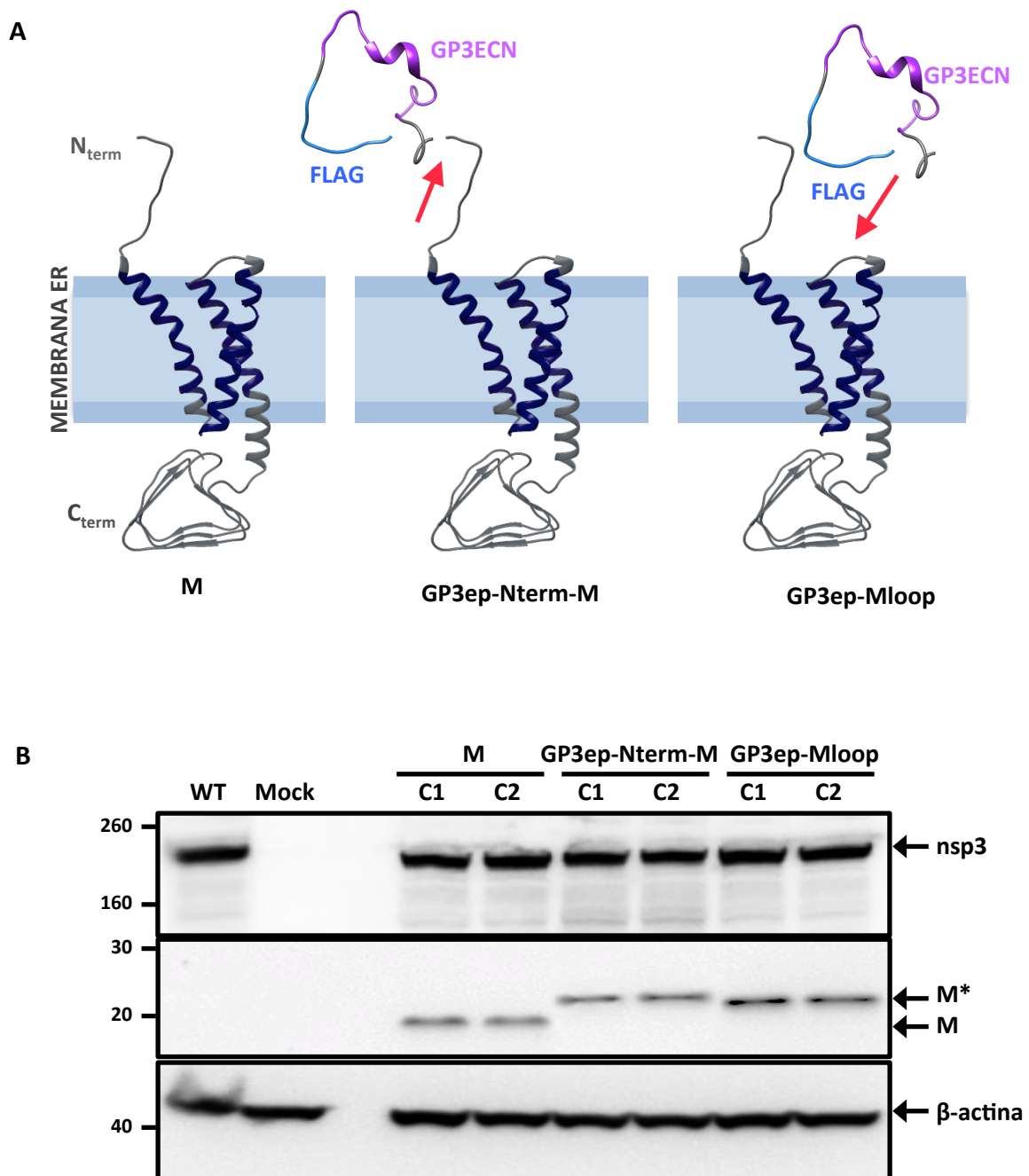


Figura 21. Proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop y expresión con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Modelo estructural de la proteína M del PRRSV y de las proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop. La flecha roja indica la localización en la que se insertó el dominio GP3ep,

perteneciente a la proteína GP3 que incluía el epítipo reconocido por anticuerpos neutralizantes (GP3ECN, violeta), fusionado a un epítipo FLAG (FLAG, azul oscuro. En añil se indican los dominios transmembrana. N-term, N-terminal; C-term, C-terminal. **(B)** Detección mediante *Western blot* de las proteínas nsp3 del TGEV (nsp3), M del PRRSV (M) y β -actina como control de carga. M* indica las proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop. Se extrajo proteína total de células infectadas con los vectores rTGEV- TRS_{3a}-M (M), rTGEV- TRS_{3a}-GP3ep-NtermM (GP3ep-NtermM) y rTGEV- TRS_{3a}-GP3ep-Mloop (GP3ep-Mloop) después de dos pases en cultivos celulares. C1 y C2 representan dos clones diferentes de cada vector. Los números a la izquierda indican la masa molecular en KDa.

Estas construcciones quiméricas se clonaron reemplazando a los genes no esenciales 3a y 3b del TGEV en el cDNA infectivo. Los virus recombinantes rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM y rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop se rescataron, con títulos de 2.2×10^8 pfu/ml y 9.8×10^7 pfu/ml, similares al virus parental rTGEV-WT (1.4×10^8 pfu/ml). La expresión de la proteína heteróloga se evaluó mediante *Western blot* empleando un anticuerpo específico para la proteína M, que reconocía las tres construcciones, y se comprobó que los niveles de expresión eran similares en todos los casos (Fig. 21B).

4.2. Análisis de la estabilidad de los vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan las construcciones quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop

La estabilidad genética de los vectores rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM y rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop se evaluó mediante el análisis de la región del gRNA en la que se introdujo el módulo de expresión heterólogo. Después de 8 y 16 pases en cultivos celulares, se obtuvieron 10 clones independientes de cada uno de los recombinantes, y se analizó la presencia de la construcción heteróloga en el genoma viral, mediante RT-PCR y secuenciación, así como la expresión de los sgRNAs correspondientes. Este análisis mostró una elevada estabilidad de ambos vectores, dado que un 100% de los clones aislados después de 8 pases en cultivos celulares conservaron el inserto introducido, y expresaron el sgRNA heterólogo (Fig. 22A). Después de 16 pases, un 90% de los clones analizados mantuvieron el gen heterólogo en el caso de la construcción GP3ep-NtermM, y el 100% en el caso de la construcción GP3ep-Mloop (Fig. 22A). Estos datos indicaron que la expresión de pequeños dominios antigénicos empleando la estructura de la proteína M de PRRSV como matriz mantenía la elevada estabilidad genética observada en los vectores que expresan solamente la proteína M.

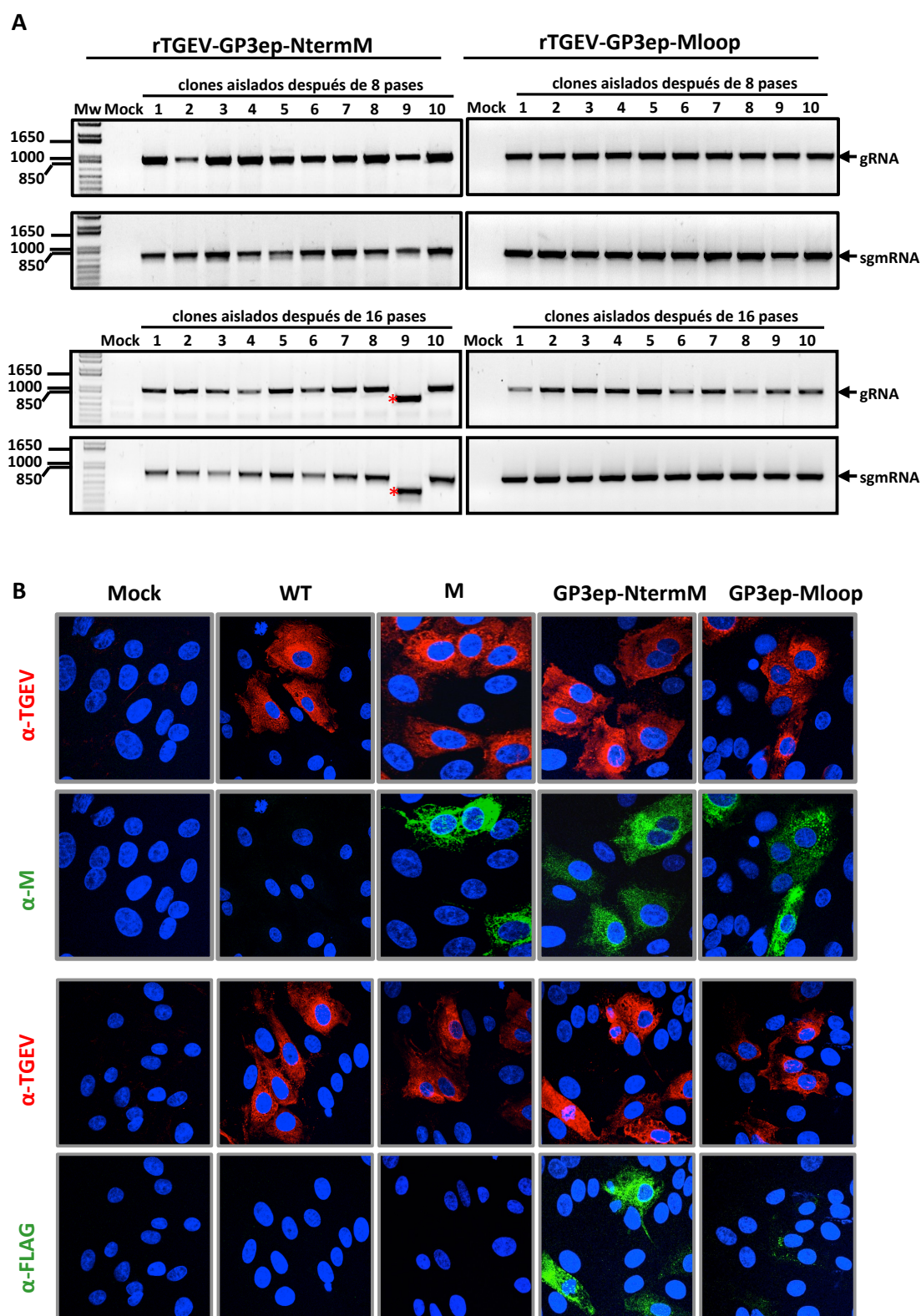


Figura 22. Estabilidad y detección de la expresión de las proteínas quiméricas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop con vectores basados en el genoma del rTGEV. (A) Análisis mediante RT-PCR de diez clones aislados de los vectores rTGEV-TRS_{3a}- GP3ep-NtermM (GP3ep-NtermM) y rTGEV-TRS_{3a}- GP3ep-Mloop (GP3ep-Mloop) después de 8 (paneles superiores) o 16 pases (paneles inferiores) en cultivos celulares. Se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye el gen heterólogo (gRNA) y el sgmRNA

correspondiente (sgmRNA). Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases, y la flecha a la derecha indica el tamaño esperado del producto de PCR en cada caso. Las bandas de menor tamaño al esperado (indicadas mediante asteriscos rojos) corresponden a productos en los que se habían eliminado fragmentos del gen heterólogo. **(B)** Análisis de la expresión de las proteínas GP3ep-NtermM y GP3ep-Mloop con vectores derivados del rTGEV mediante inmunofluorescencia. Monocapas de células ST no infectadas (Mock) o infectadas con el rTGEV-WT, o el pase 16 de los rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM (GP3ep-NtermM) y rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop (GP3ep-Mloop) a moi 0.5 se fijaron 8 hpi. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para la proteína M del PRRSV o el epítipo FLAG (verde), junto con anticuerpos específicos para el TGEV (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

Para analizar la expresión y acumulación de las proteínas quiméricas expresadas por el vector rTGEV, se realizó una inmunofluorescencia doble de células infectadas con los rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM o rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop después de 16 pases en cultivos celulares. Las proteínas M quiméricas se detectaron en el 95% de las células infectadas, de forma similar en ambos recombinantes (Fig. 22B). Este nivel de detección fue similar al obtenido en el caso del recombinante rTGEV-TRS_{3a}-M que expresaba la proteína M del PRRSV (Fig. 22B). Estos datos confirmaron la alta estabilidad de los vectores que expresaban quiméricas, e indicaron que la introducción de pequeños dominios en el esqueleto de la proteína M del PRRSV no afectó a su acumulación en la célula o a la estabilidad de su expresión por el vector derivado del rTGEV. El epítipo FLAG, introducido en las construcciones quiméricas fusionado al epítipo de interés de la proteína GP3 del PRRSV, se detectó en un 92% de las células infectadas con el rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM. Sin embargo, sólo se detectó en un 63% de las células infectadas con el rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-Mloop (Fig. 22B). Esta observación sugirió que el extremo N-terminal de la proteína M permitía una mayor exposición de los epítopos insertados y, por lo tanto, sería más apropiado para la presentación de antígenos. Estos resultados estaban de acuerdo con datos publicados previamente que señalaban que la sustitución del ectodominio de la proteína M del PRRSV por el ectodominio de la proteína M de otros arterivirus permite la obtención de virus viables, indicando la plasticidad de este dominio (Verheije y col., 2002). Nuestros datos expandieron estas observaciones indicando que, además, el ectodominio de la proteína M del PRRSV se podía utilizar para la exposición de dominios antigénicos de otras proteínas.

5. PROTECCIÓN FRENTE AL PRRSV INDUCIDA POR VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV QUE EXPRESAN ESTABLEMENTE ANTÍGENOS DEL PRRSV

Los vectores derivados del rTGEV que expresan de forma estable dominios de las proteínas del PRRSV se utilizaron en un estudio de protección en lechones, como se describe en el apartado 10.2. de Materiales y Métodos (Fig. 23). Para la inmunización, los lechones se dividieron en 3 grupos de 15 animales cada uno, de forma que los cerdos del grupo 1 (inmunizados) se inocularon con una mezcla de 1×10^8 pfu/animal de cada uno de los siguientes rTGEVs: rTGEV-TRS_{3a}-GP3fr, rTGEV-TRS_{3a}-GP4fr, rTGEV-TRS_{3a}-GP5fr-TRS_{22N}-M, rTGEV-TRS_{3a}-M y rTGEV-TRS_{3a}-GP3ep-NtermM. Los distintos recombinantes se reunieron en un mismo ensayo debido al elevado coste de este tipo de experimentos. Los cerdos de los grupos 2 (no inmunizado) y 3 (control) fueron inoculados con 1×10^8 pfu/animal del rTGEV-WT. Dos semanas después de la primera inmunización, los animales recibieron una segunda inmunización en las mismas condiciones que la primera. El desafío se realizó cuatro semanas después de la primera inmunización, inoculando a los lechones de los grupos 1 y 2 con 10^6 TCID₅₀/animal de la cepa virulenta del PRRSV, PRRSV-Olot91-like, por ruta intranasal.

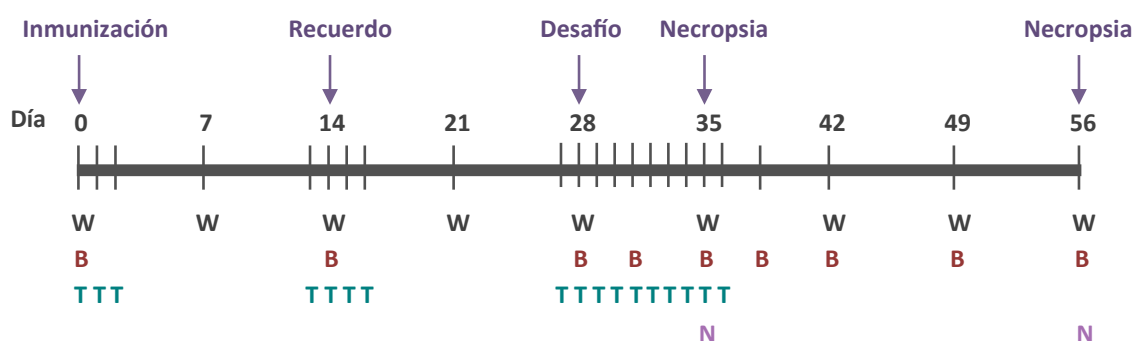


Figura 23. Protocolo de evaluación *in vivo* de vectores basados en el genoma de rTGEV que expresan proteínas del PRRSV. Esquema del experimento de protección en cerdo, en el que el tiempo de referencia es el momento de la primera inmunización (día 0). Se administró una dosis de recuerdo a los 14 días, y se realizó un desafío a los 28 días. Las necropsias (N) se realizaron a los días 35 (7 después del desafío) y 56 (28 después del desafío). Se monitorizó periódicamente el peso (W) y la temperatura (T) de los animales y se realizaron sangrados periódicos (B).

5.1. Evaluación de los síntomas clínicos

Los animales que fueron infectados con la cepa virulenta del PRRSV (grupos 1 y 2) desarrollaron síntomas clínicos de la enfermedad, incluyendo fiebre moderada durante la primera semana de infección, letargia y síntomas respiratorios como taquipnea y

respiración abdominal. Estos síntomas persistieron hasta el día 24 después del desafío. El porcentaje de animales que mostró síntomas respiratorios fue superior en el grupo de animales no inmunizados que en el grupo de animales inmunizados (Fig. 24). Estos datos indicaron que la inmunización con los rTGEVs que expresaban antígenos del PRRSV protegía a los animales frente a los síntomas clínicos de la enfermedad. El peso de los animales se monitorizó cada siete días, observándose una reducción en la media de la ganancia de peso diaria en los animales desafiados en comparación con los animales control. La ganancia de media de peso fue superior en los animales inmunizados que en los no inmunizados entre los días 21 y 28 después del desafío (datos no mostrados), lo que sugirió recuperación más rápida de la infección por el PRRSV en los animales inmunizados.

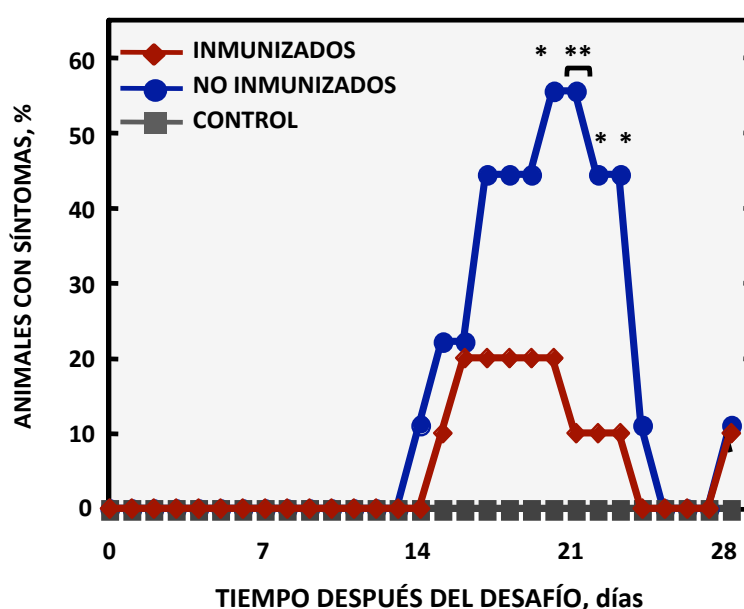


Figura 24. Protección frente a los síntomas clínicos causados por el PRRSV en los animales inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV. Porcentaje de animales por grupo experimental que mostraron síntomas respiratorios de la enfermedad causada por el PRRSV. La monitorización se hizo diariamente, durante los 28 días siguientes al desafío. **, p-valor < 0.05, *, p-valor < 0.1.

5.2. Evaluación del daño pulmonar

En animales jóvenes, el PRRSV se caracteriza por causar fundamentalmente una patología respiratoria. A los días 35 y 56 después de la primera inoculación (7 y 28 después del desafío) (Fig. 23) se sacrificaron 5 y 10 animales por grupo, respectivamente, y se analizó la patología en pulmón. En todos los animales desafiados se observaron lesiones

macroscópicas como neumonía, ausencia de colapso pulmonar y edema intersticial (datos no mostrados).

Para analizar el daño pulmonar a nivel microscópico se obtuvieron microsecciones de los pulmones de cinco animales de cada grupo 28 días después del desafío, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron los cambios histopatológicos. En los pulmones de los animales desafiados se observaron síntomas característicos de la infección por el PRRSV, como hiperplasia e hipertrofia de neumocitos y acumulación de infiltrados leucocitarios (Fig. 25). Debido a la gran variabilidad en el grado de afectación de los pulmones, el daño se estimó valorando 50 campos microscópicos elegidos al azar para cada animal, atendiendo en cada caso al grado de inflamación intersticial, perivascular y peribronquiolar (Page y col., 2012). Los pulmones correspondientes a animales inmunizados mostraron menor daño pulmonar que los correspondientes a animales no inmunizados, lo que indicó que la inmunización confería un cierto grado de protección (Fig. 25).

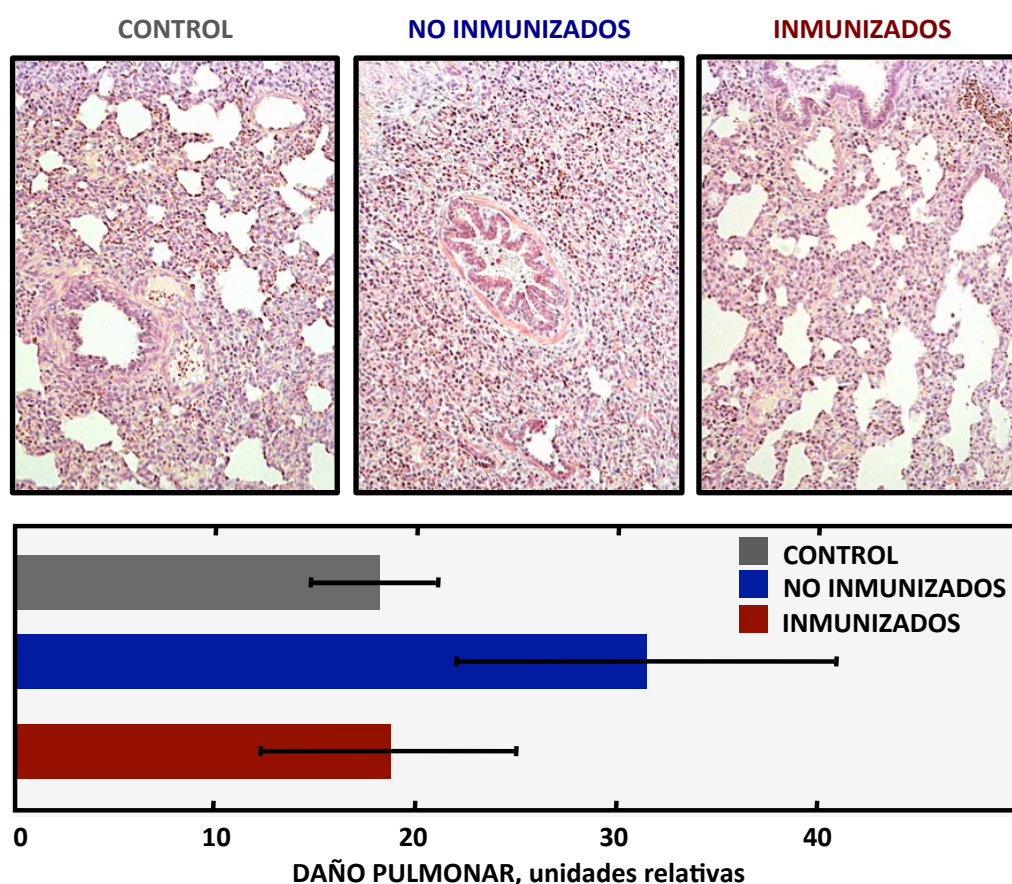


Figura 25. Histopatología de pulmón en los animales inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV. Fragmentos representativos de los pulmones de los animales se obtuvieron en el momento de la necropsia, 28 días después del desafío, se fijaron con paraformaldehído, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los paneles superiores muestran cortes representativos de cada grupo experimental, visualizados con un objetivo 10x. En el panel inferior se

presenta una estimación del daño pulmonar para cada grupo experimental después del análisis de 50 campos aleatorios para cada animal en base a los criterios de Page y col, 2012. Se representa la media de cinco animales de cada grupo. Las barras de error indican la desviación estándar.

5.3. Evaluación de la carga viral

Para evaluar si el grado de protección observado se correlacionaba con una menor carga viral, se evaluó la presencia de RNA viral en pulmón y en suero a diferentes tiempos después del desafío mediante RT-qPCR. Se detectó RNA viral en pulmón en todos los animales, indicando que el virus utilizado en el desafío había alcanzado el órgano diana en todos los casos (Fig. 26A). Se observó una reducción de la carga viral 28 días después del desafío, aunque no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de animales inmunizado y no inmunizado (Fig. 26A). La viremia, indicada por la carga viral en el suero de los animales, alcanzó 10^5 pfu/ml, siendo elevada desde el primer tiempo analizado, y persistiendo durante toda la infección experimental (Fig. 26B). Durante los tiempos iniciales después del desafío, los niveles de viremia fueron similares en los grupos inmunizado y no inmunizado. Sin embargo, a partir del día 14 se observó una reducción significativamente mayor en los animales inmunizados. Estos resultados sugirieron una eliminación del virus más rápida en el grupo de animales inmunizado, en comparación con los animales no inmunizados.

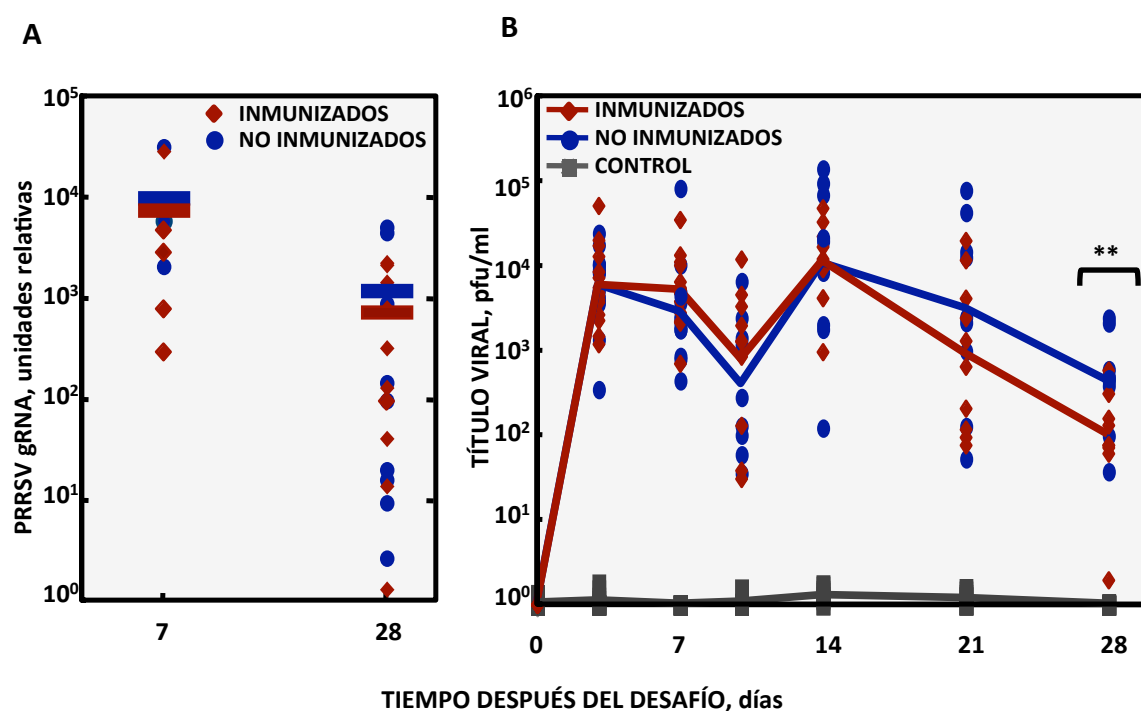


Figura 26. Efecto de la inmunización con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV en la infección con PRRSV. (A) Se extrajo el RNA total de fragmentos representativos de los

pulmones obtenidos en la necropsia, a 7 y 28 días después del desafío. Se muestran los niveles de gRNA del PRRSV, estimados mediante RT-qPCR, relativos a los valores obtenidos en los animales no infectados. Los puntos representan los valores para animales individuales, y las líneas horizontales, la media de cada grupo. **(B)** Título del PRRSV en suero. Se aisló el RNA total de las muestras del suero a los tiempos indicados después del desafío, y se estimó el título viral en cada caso mediante RT-qPCR, utilizando la recta patrón obtenida previamente (Fig. 9). Los puntos representan los valores para animales individuales, y las líneas representan la media de cada grupo. **, p-valor < 0.05.

5.4. Análisis de la respuesta inmune frente al PRRSV inducida por vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan establemente antígenos de PRRSV

5.4.1. Respuesta inmune humoral

Para evaluar la inmunogenicidad de los dominios expresados por los vectores basados en el genoma del rTGEV, y su capacidad de inducir anticuerpos frente a las proteínas del PRRSV, se analizó la respuesta inmune humoral inducida en cada grupo frente a diferentes antígenos empleados en la inmunización. Todos los animales desarrollaron una elevada respuesta frente al rTGEV, indicando que el vector había alcanzado los órganos diana eficazmente, a pesar de que varios animales empleados en el estudio eran seropositivos para el TGEV en el momento de la inmunización (Fig. 27). En los animales desafiados se observó seroconversión para el PRRSV completo a partir del día 10 después del desafío (Fig. 27). La seroconversión frente a la proteína N del PRRSV siguió una cinética muy similar a la observada frente al virus completo (Fig. 27). Estos resultados estaban de acuerdo con datos previos que indican que la mayoría de los anticuerpos producidos después de la infección con el PRRSV están dirigidos frente a la proteína N, que contiene los epítomos inmunodominantes del virus (Yoon y col., 1995; Plana-Durán y col., 1997), y no tienen capacidad de neutralizar al virus. La aparición de anticuerpos específicos para las proteínas GP3, GP4 y GP5 se detectó en animales desafiados a partir del día 14 después del desafío. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales inmunizados y no inmunizados en la respuesta frente a las proteínas GP3 y GP4 (Fig. 27). Sin embargo, los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos específicos para la proteína GP5 de una forma más rápida y con mayor nivel, existiendo diferencias significativas entre los dos grupos, a los días 14 y 21 (Fig. 27). Estos resultados sugirieron que el fragmento GP5fr incluido en la mezcla vacunal era inmunogénico.

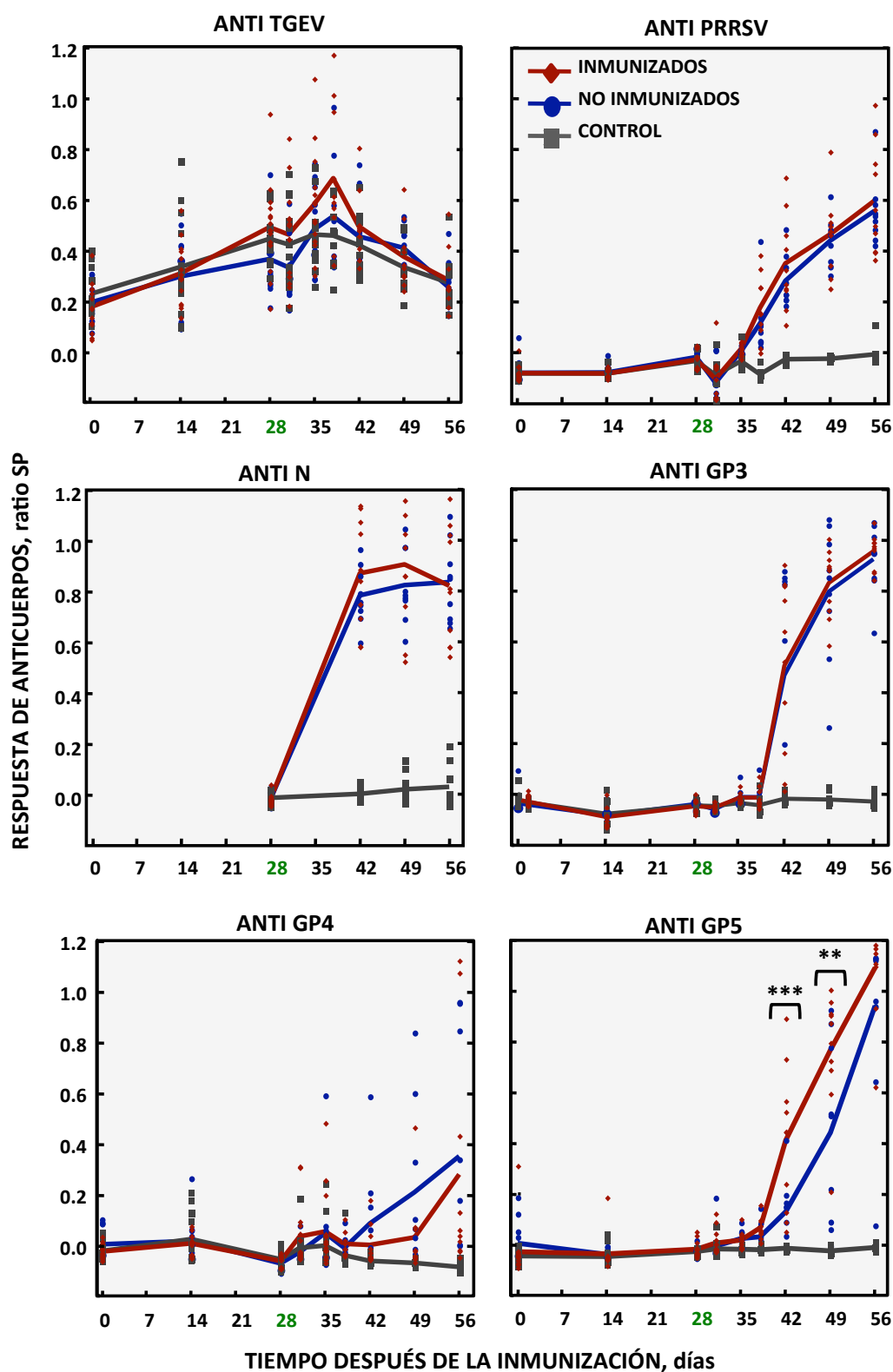


Figura 27. Respuesta humoral inducida por la inmunización con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV. Detección de anticuerpos en suero a los tiempos indicados después de la inmunización. El día del desafío (28) se indica en verde. Se evaluó por ELISA la respuesta humoral específica frente a los virus TGEV y PRRSV parcialmente purificados, o frente a las proteínas purificadas N, GP3, GP4 y GP5 del PRRSV expresadas en células de insecto. Los puntos representan los valores para animales individuales, y las líneas representan la media de cada grupo. **, p-valor < 0.05; ***p-valor < 0.01.

El principal epítipo inductor de anticuerpos neutralizantes frente al PRRSV se encuentra en la proteína GP5. Por lo tanto, se evaluó la capacidad neutralizante de los sueros correspondientes a los días en los que se observaron diferencias en los niveles totales de anticuerpos frente a la proteína GP5. Los sueros procedentes de animales no inmunizados mostraron un mayor poder de neutralización que los correspondientes a animales inmunizados, existiendo diferencias significativas a los días 21 y 28 después del desafío (Fig. 28). La aparente contradicción entre los niveles de anticuerpos totales frente a la proteína GP5 y de anticuerpos neutralizantes. En línea con los datos obtenidos, y dado que la respuesta neutralizante es de aparición tardía durante la infección con el PRRSV, la protección parcial de los animales inmunizados habría evitado la inducción de una respuesta neutralizante elevada.

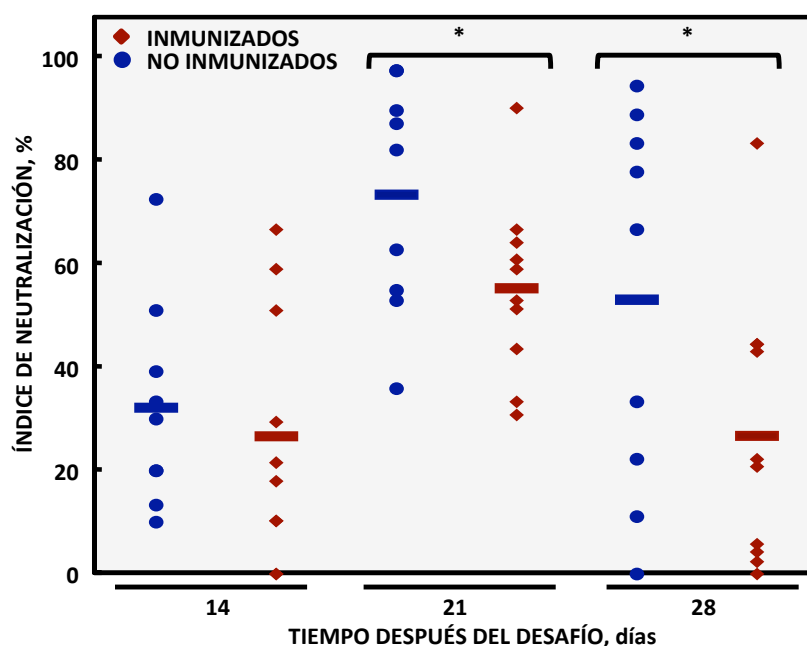


Figura 28. Respuesta de anticuerpos neutralizantes en animales inmunizados y no inmunizados con vectores derivados del genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV. Capacidad neutralizante de los sueros de los animales inmunizados y no inmunizados a los tiempos indicados después del desafío. El ensayo de neutralización se realizó con la cepa PRRSV-Olot91, sobre células MARC-145. Los puntos representan los valores para animales individuales, y las líneas representan la media de cada grupo. *, p-valor < 0.1.

5.4.2. Evaluación de citoquinas circulantes en suero

Para obtener una visión general de la respuesta inmune inducida después de la inmunización en cada uno de los grupos, se evaluó la presencia de citoquinas en suero mediante un ensayo de Luminex, específico para las citoquinas IL-1 β , IL-10, IL4, TNF, IFN- α ,

IFN- γ , e IL-8 porcinas, obteniéndose niveles detectables de las tres últimas. En el caso del IFN- α , se observó una inducción de corta duración inmediatamente después del desafío, que fue más alta (aunque no estadísticamente significativa) en los animales inmunizados que en los no inmunizados (Fig. 29). Este resultado sugirió que los animales inmunizados desarrollaron una respuesta inmune innata más fuerte que los no inmunizados. Debido a que la inducción de la respuesta inmune innata está fuertemente inhibida durante la infección con el PRRSV, este resultado podría indicar un efecto positivo de la inmunización. A pesar de esto, la respuesta inmune innata inducida no pareció suficiente para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa fuerte. Los niveles de IFN- γ fueron similares en los grupos de animales inmunizados y no inmunizados, observándose una coincidencia temporal de los niveles de esta citoquina con la viremia (datos no mostrados). Los niveles de IL-8 en suero fueron significativamente menores en los animales inmunizados comparados con los animales no inmunizados (Fig. 29). La IL-8 es una citoquina proinflamatoria, por lo que los niveles más elevados de esta citoquina en suero en los animales no inmunizados correlacionaron con el mayor daño pulmonar observado en este grupo. Este resultado estaba de acuerdo con estudios previos en los que se muestra que los animales con síntomas más severos, incluyendo viremia y lesiones pulmonares presentan niveles elevados de IL-8 en suero durante largo tiempo después de la infección, mientras que en los animales que desarrollan menos síntomas clínicos los niveles de IL-8 se recuperan en la primera semana después de la infección (Petry y col., 2007).

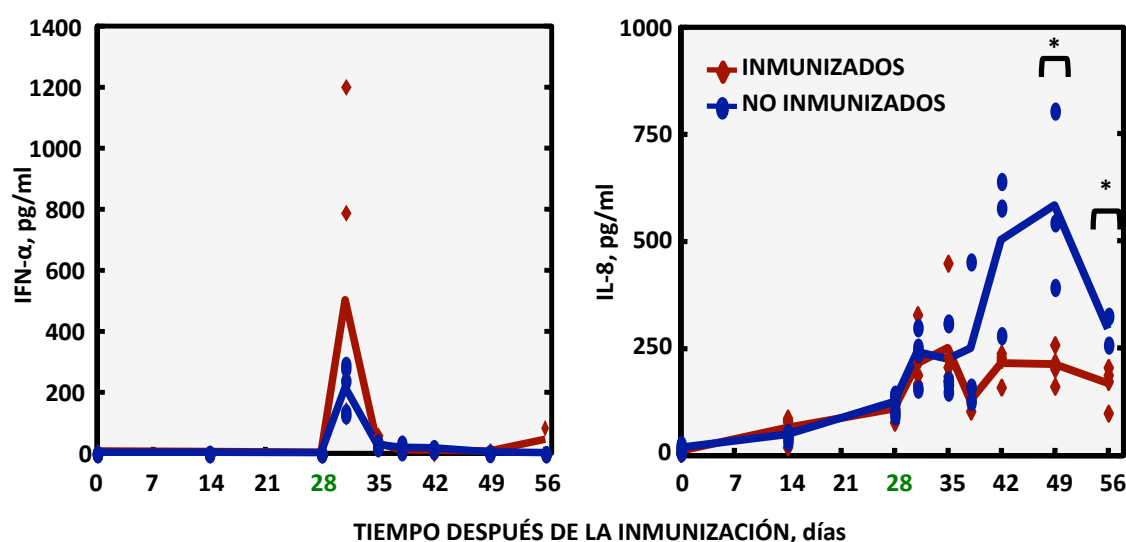


Figura 29. Citoquinas circulantes en el suero en animales inmunizados y no inmunizados con vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan antígenos del PRRSV. Concentración de IFN- α (A) e IL-8 (B)

en suero a los tiempos indicados después de la inmunización. El día del desafío (28) se indica en verde. Muestras de suero extraídas el mismo día y pertenecientes al mismo grupo de animales se mezclaron en grupos de tres, con proporciones equivalentes de cada muestra, y se analizaron empleando la tecnología Luminex. Los puntos representan los valores de cada muestra y las líneas la media de cada grupo. *, p-valor < 0.1.

6. ATENUACIÓN DE VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DEL rTGEV MEDIANTE MUTACIONES EN GENES DE LA REPLICASA

Los vectores vacunales que replican en el huésped dan lugar a una estimulación inmunológica más efectiva, pero su capacidad de replicar está unida a la posibilidad de reversión, dando lugar a fenotipos virulentos. Por ello, para aumentar el nivel de bioseguridad de los vectores vacunales, es aconsejable introducir varios mecanismos de atenuación. En esta tesis, se ha estudiado la proteína nsp14 como posible diana para la atenuación de vectores basados en el genoma del TGEV. Además, debido a la elevada conservación filogenética de la proteína nsp14, puede servir como modelo de atenuación para otros CoVs. De hecho, se han descrito mutantes de la proteína nsp14 que afectan a distintas regiones de la proteína y que conducen a un fenotipo atenuado en los virus MHV y SARS-CoV (Sperry y col., 2005; Graham y col., 2012). En estudios de sobre-expresión *in vitro* se ha demostrado que la proteína nsp14 de CoVs es antagonista del IFN (Shi y col., 2014). En este sentido, la modulación de la respuesta inmune innata es un factor esencial en el estudio de la virulencia, dado que una respuesta elevada puede limitar la infección viral, pero también causar una respuesta inflamatoria excesiva que desencadene daño tisular. En el caso de los vectores virales, una respuesta excesiva puede limitar la expresión del gen heterólogo (Zeier y col., 2009). Además, se ha descrito que la eliminación selectiva de genes virales inmunomoduladores, en vectores derivados del virus vaccina, mejora la respuesta inmune inducida frente a los antígenos heterólogos (García-Arriaza y col., 2013; Perdiguero y col., 2013; García-Arriaza y col., 2014).

6.1. Generación de replicones del TGEV mutantes en la proteína nsp14

La proteína nsp14 interacciona con la RdRp, y forma parte del núcleo del RTC de CoVs (Sevajol y col., 2014; Smith y col., 2014). Además de su importancia como enzima correctora de errores, se ha propuesto que la actividad ExoN de CoVs interviene en el proceso de síntesis de RNA viral, dado que mutantes del MHV y del SARS-CoV que carecen de esta actividad muestran una reducción en los niveles de síntesis y acumulación de RNA

(Minskaia y col., 2006; Eckerle y col., 2007). Se ha postulado que la actividad ExoN de la proteína nsp14 podría procesar los extremos incompletos de las cadenas negativas de RNA, promoviendo el cambio de molde durante la transcripción, si bien el mecanismo específico se desconoce (Denison y col., 2011). Además, la proteína nsp14 presenta actividad N7-MTasa implicada en la síntesis del 5'cap, entre cuyas funciones se encuentra la regulación de la estabilidad de los mRNAs (Chen y col., 2009).

La proteína nsp14 está filogenéticamente muy conservada entre los diferentes géneros de CoVs, lo que permitió el modelado estructural de la proteína nsp14 del TGEV en base a la estructura resuelta de la proteína nsp14 del SARS-CoV (Ma y col., 2015). Los motivos estructurales descritos en la proteína nsp14 del SARS-CoV se identificaron en la proteína nsp14 del TGEV (Fig. 30).

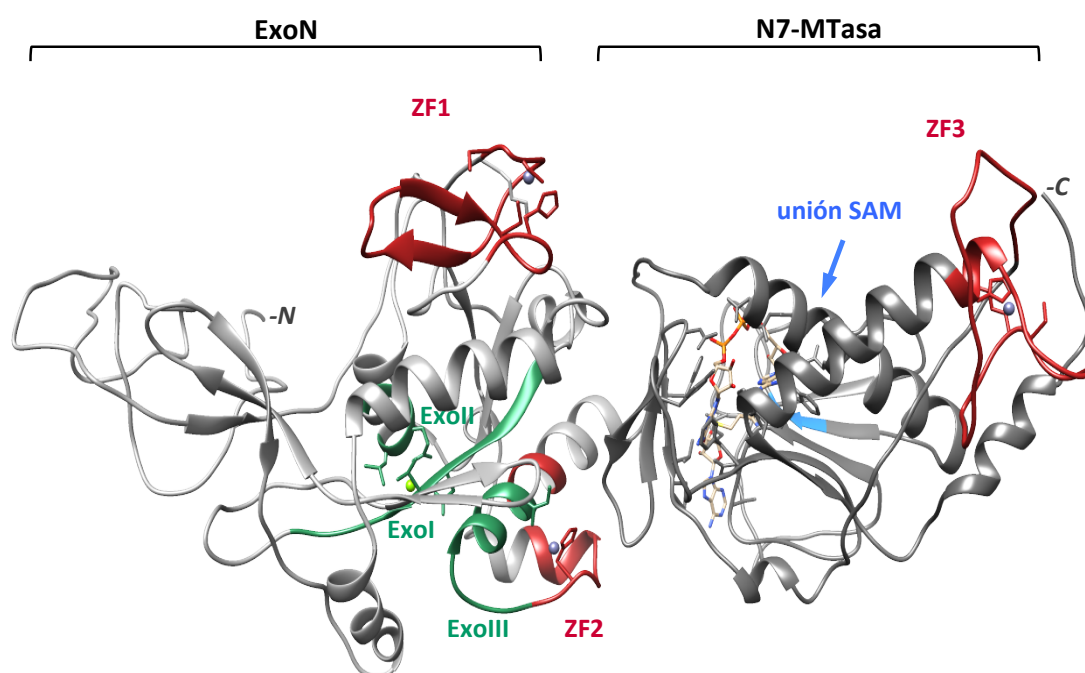


Figura 30. Motivos estructurales y funcionales de la proteína nsp14 del TGEV. Modelo estructural de la proteína nsp14 del TGEV, obtenido utilizando el *software* RaptorX. En la figura se indican los extremos N- y C-terminal y los dominios ExoN (gris claro) y N7-MTasa (gris oscuro). Los motivos ExoI, ExoII y ExoIII, que forman el centro activo de la actividad ExoN se indican en verde, el dominio de unión al cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) se indica en azul y los dedos de zinc (ZF), ZF1, ZF2 y ZF3 se indican en rojo. Se muestran también la molécula de SAM y los heteroátomos de zinc (morado) y magnesio (verde claro).

La relevancia de diferentes dominios de la proteína nsp14 en la síntesis de RNA viral se estudió utilizando un replicón derivado del genoma del TGEV (REP-2) que incluye el gen de la replicasa y los genes N y 7 (Almazan y col., 2004). Se diseñaron cuatro grupos de mutantes en la proteína nsp14 que afectaban a los diversos motivos descritos (Fig. 30), incluyendo mutantes puntuales y mutantes de delección. Dos de estos mutantes afectaban a los motivos ExoI y ExoIII, que forman el centro catalítico responsable de la actividad ExoN. En estos mutantes, los aminoácidos ácidos DE/E implicados en el mecanismo enzimático se reemplazaron por alanina (Fig. 31A), dado que estas mutaciones anulan la actividad ExoN *in vitro* en las proteínas del HCoV-229E y del SARS-CoV (Minskaia y col., 2006; Bouvet y col., 2012). Además, estas mutaciones provocan la atenuación de SARS-CoV (Graham y col., 2012). La proteína nsp14 contiene en su estructura dos dedos de zinc (ZFs) en su dominio ExoN (ZF1 y ZF2) y uno más en su dominio N7-MTasa (ZF3) (Ma y col., 2015). Los ZFs son pequeños motivos estructurales que coordinan iones Zn^{2+} a través de una combinación de residuos de cisteína e histidina. Estos dominios, que normalmente aparecen en tándem en la estructura de las proteínas, funcionan como módulos de interacción en la unión a DNA, RNA, proteínas y moléculas pequeñas (Krishna y col., 2003; Iuchi y Kuldell, 2005). Un segundo grupo de mutantes incluyó dos variantes que afectaban al ZF1, cambiando residuos de cisteína o histidina implicados en la coordinación del ión Zn^{2+} , de forma que se alteraría el tipo de ZF, pero en teoría permitiría la coordinación del Zn^{2+} (Fig. 31A). El dominio ZF2 no se modificó dado que solapa con el motivo ExoIII y, por tanto, su modificación podría alterar la actividad catalítica ExoN (Ma y col., 2015). Las mutaciones en el dominio N7-MTasa incluyeron un mutante puntual y cinco mutantes de delección. El primero afectaba a la unión del cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) (Fig. 31A), y anula *in vitro* la actividad N7-MTasa sin afectar a la actividad ExoN (Chen y col., 2013). Finalmente, se generaron cinco mutantes en los que se eliminaron diversas regiones del dominio C-terminal no estudiadas hasta el momento (Fig. 31B). Estas regiones se seleccionaron por su conservación filogenética en los distintos géneros de CoV.

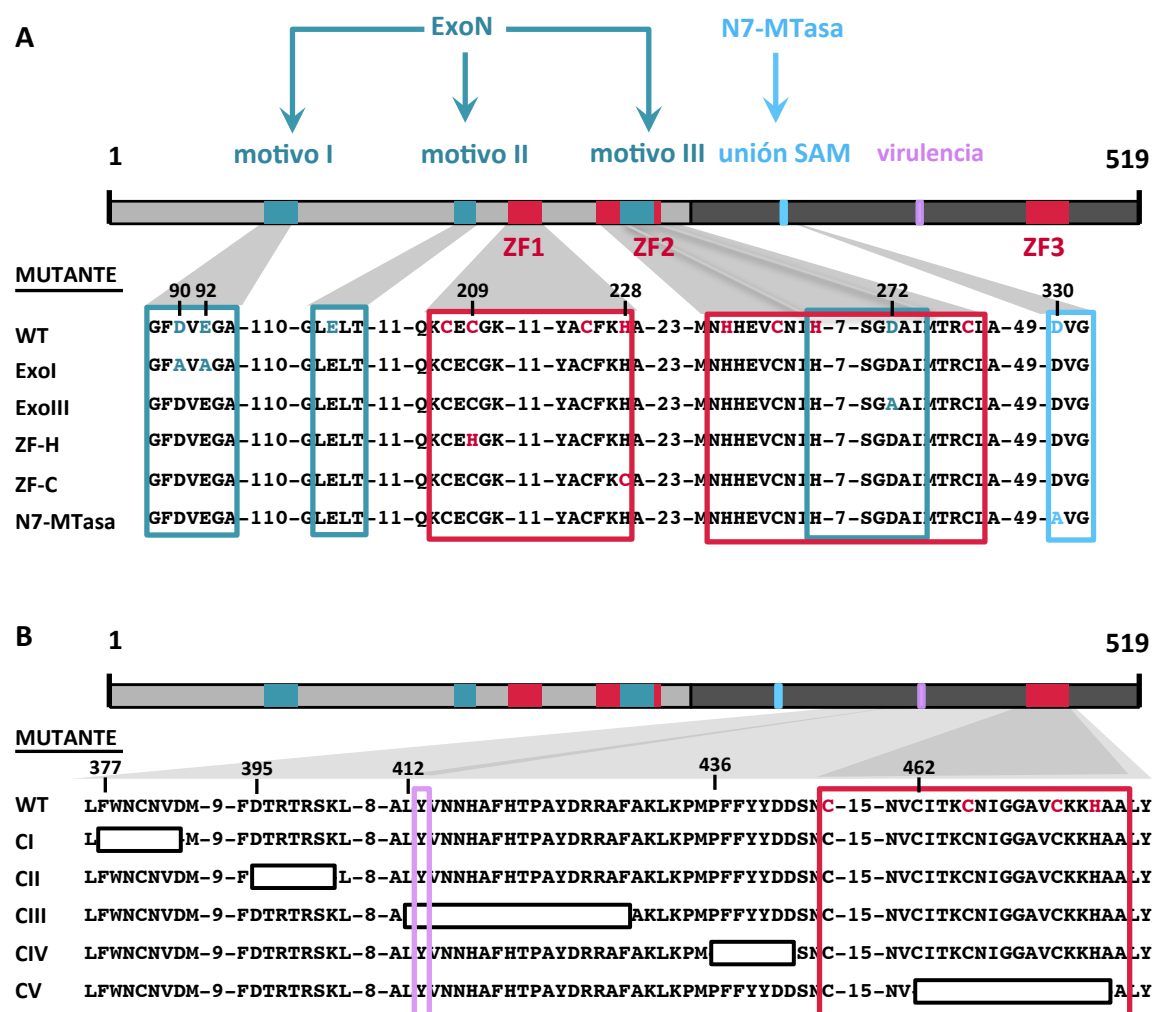


Figura 31. Generación de replicones del TGEV con mutaciones en la proteína nsp14. Representación esquemática de la proteína nsp14 del TGEV indicando los dominios ExoN (gris claro) y N7-MTasa (gris oscuro). Los motivos ExoI, ExoII y ExoIII, que forman el centro activo de la actividad ExoN se indican en verde, el dominio de unión al cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) se indica en azul, los motivos dedos de zinc (ZF), ZF1, ZF2 y ZF3 se indican en rojo y un residuo de tirosina vinculado con virulencia en el MHV se indica en morado. **(A)** Alineamientos parciales indicando, en el color correspondiente al dominio, los aminoácidos involucrados en la actividad en la secuencia parental (WT). En las secuencias correspondientes a los mutantes, los aminoácidos mutados en cada caso se indican en el color correspondiente al dominio. Los números en la parte superior indican la posición en aminoácidos, en la secuencia de la proteína, de los aminoácidos mutados. **(B)** Mutantes de delección, que se indican con un rectángulo blanco. Los números en la parte superior indican la posición en aminoácidos, en la secuencia de la proteína, del primer aminoácido deletado en cada caso.

Los cDNAs se transfectaron en células BHK que expresaban la proteína N del TGEV (BHK-N) dado que esta proteína es esencial para la síntesis eficiente del RNA viral (Zuñiga y col., 2010). Los niveles de replicación y transcripción se evaluaron 24 hpt, evaluando mediante RT-qPCR la acumulación de gRNA y sgRNA del gen 7 (sgmRNA-7), respectivamente. Los valores resultantes se hicieron relativos a los obtenidos para un replicón no replicativo

(NR), que codificaba una replicasa inactiva, y que permitió establecer los niveles basales de RNA viral producidos por la transcripción a partir del promotor del CMV. Los niveles de sgRNA se hicieron relativos además a los niveles de gRNA de cada replicón. Las mutaciones diseñadas tuvieron un impacto moderado en replicación, con una reducción en la acumulación del gRNA que, a excepción del mutante CI, era de menos de 5 veces con respecto a los niveles producidos por el replicón WT (Fig. 32A). Por el contrario, la mayoría de las mutaciones resultaron en niveles de acumulación del sgRNA-7 comparables a los obtenidos con el control no replicativo (Fig. 32B). Estos resultados indicaron que las mutaciones en la proteína nsp14 afectaban principalmente al proceso de transcripción. Las mutaciones en los motivos Exol y ExoIII produjeron una reducción inferior a 3 veces en los niveles de replicación y transcripción, en el límite de la significancia estadística, en comparación con el replicón WT (Fig. 32). Las mutaciones en el dominio ZF1 produjeron dos resultados opuestos. En el mutante ZF-H se observó una reducción de 3.6 veces en la acumulación de gRNA, mientras que los niveles de sgRNA-7 eran similares a los del control negativo (Fig. 32). Por el contrario, el mutante ZF-C era competente tanto en replicación como en transcripción (Fig. 32). Estos datos indicaron la relevancia del dominio ZF1 para la función de la proteína nsp14, pues alteraciones en este motivo afectaban drásticamente a la transcripción viral. El mutante N7-MTasa acumuló gRNA y sgRNA-7 con niveles similares al replicón WT, lo que indicó que esta mutación no tenía efecto en la síntesis de RNA viral (Fig. 32). Finalmente, las cinco mutaciones de delección generadas produjeron una reducción drástica de los niveles de sgRNA-7 (Fig. 32B). Estos resultados sugirieron que la eliminación de estas secuencias da lugar a un plegamiento incorrecto de la proteína, originando proteínas no funcionales o impidiendo interacciones esenciales en el RTC. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos al eliminar de 1 a 5 aminoácidos en el dominio N-terminal de la proteína nsp14 del SARS-CoV, que resultan en la pérdida de la actividad o producen mutantes termosensibles cuando se evalúan en un sistema de levadura, lo que sugiere que la introducción de deleciones desestabiliza la estructura terciaria de la proteína (Chen y col., 2013).

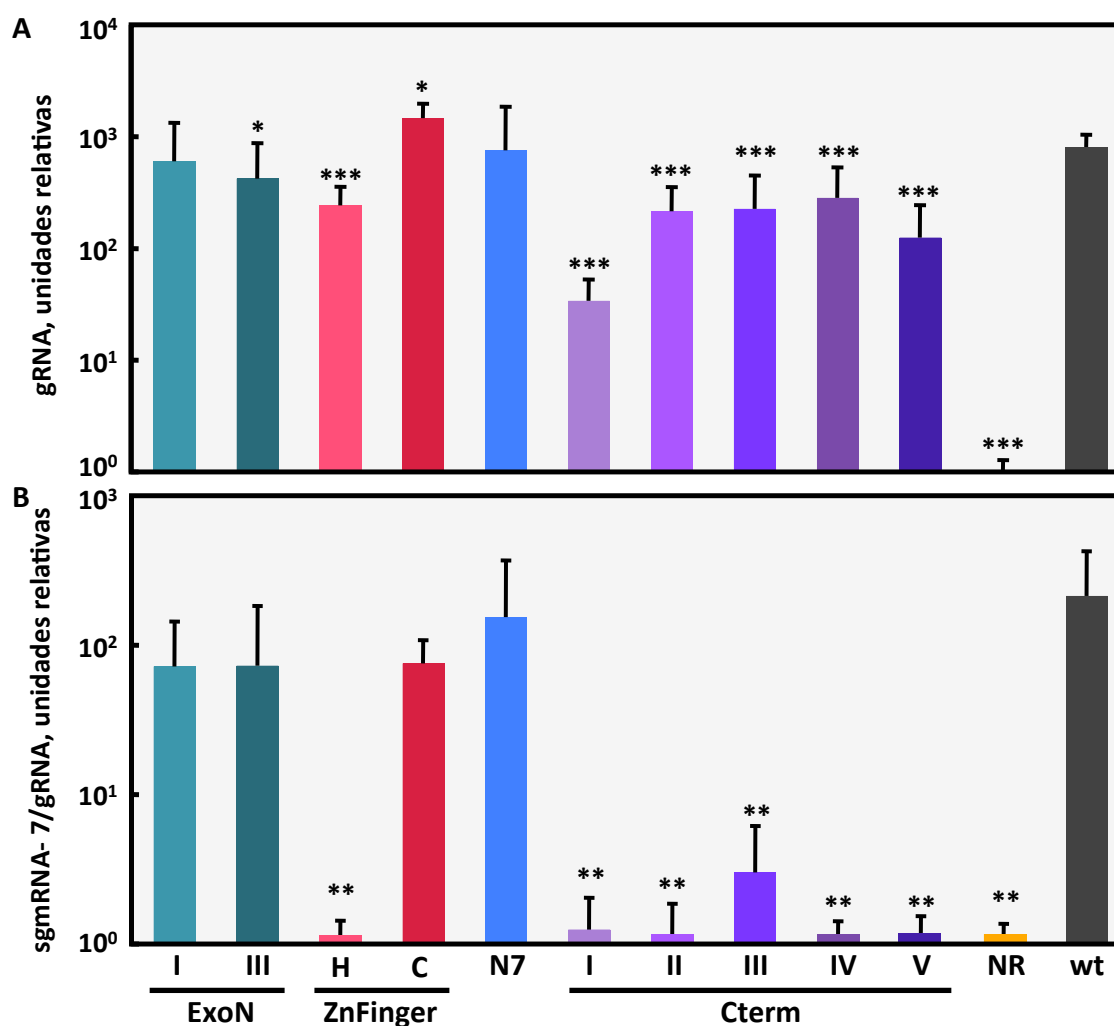


Figura 32. Efecto de la introducción de mutaciones en la proteína nsp14 en la síntesis de RNA por replicones del TGEV. Niveles de replicación (A) y de transcripción (B) evaluados mediante RT-qPCR utilizando replicones del TGEV mutantes en la proteína nsp14. Los niveles de replicación (gRNA) y transcripción (sgmRNA-7/gRNA) para cada mutante y el replicón parental (WT) se hicieron relativos a los del control no replicativo (NR), al que se dio el valor 1. Se representa la media de ocho transfecciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. *, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01; ***, p-valor < 0.001.

En conjunto, los resultados obtenidos indicaron que durante la síntesis de RNA la proteína nsp14 tiene un papel relevante en transcripción. Además, la reducción en la acumulación de sgRNA-7 detectada tanto en los mutantes de delección como en el mutante ZF-H, sugería que estas mutaciones probablemente impedirían el rescate de virus viables.

6.2. Análisis del requerimiento de la actividad ExoN para la viabilidad del TGEV

Los resultados obtenidos con el sistema del replicón del TGEV indicaron que las mutaciones ExoI y ExoIII no afectaban significativamente a la síntesis de RNA viral. Sin

embargo, según datos publicados en estudios *in vitro* estas mutaciones en el centro activo anulan la actividad ExoN (Minskaia y col., 2006; Bouvet y col., 2012). Para estudiar el papel de la actividad ExoN durante la infección por el TGEV, las mutaciones ExoI y ExoIII (Fig. 31A) se introdujeron en el cDNA infectivo del TGEV (Almazan y col., 2000). Los cDNAs mutantes se transfectaron en células BHK-pAPN que expresaban la proteína N del TGEV. Siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio para el rescate del rTGEV a partir de cDNA infectivos, 6 hpt estas células se añadieron sobre células ST susceptibles a la infección viral (Almazan y col., 2015). Después de 48 horas, el sobrenadante de las células (pase 0) se recogió y se utilizó para infectar células ST (pase 1). A diferencia de lo que ocurría con el virus parental, rTGEV-WT, en el caso de los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII no se observó efecto citopático en ningún momento después de la transfección (datos no mostrados). Para analizar si después de la transfección se producía síntesis de RNA viral, se extrajo el RNA total intracelular procedente de los pases 0 y 1, y se evaluó la presencia de RNA viral mediante RT-PCR, amplificando el gRNA en una región que incluía la secuencia codificante para la proteína nsp14, y analizando la presencia del sgRNA correspondiente a la proteína N (sgmRNA-N). En las transfecciones con el cDNA WT, se detectó RNA viral en los pases 0 y 1, lo que indicaba un rescate eficiente del virus (Fig. 33A). Por el contrario, en el caso de los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII sólo se produjo amplificación del RNA viral (tanto gRNA como sgmRNA-N) en las muestras procedentes del pase 0 (Fig. 33A). El fragmento del gRNA amplificado a partir del pase 0 se secuenció, comprobándose que contenía las mutaciones introducidas. La ausencia de RNA viral en el pase 1 indicó que las mutaciones que inactivaban la actividad ExoN resultaban letales para el TGEV, a pesar de que en el sistema de replicón no se observaba una reducción drástica de los niveles de RNA viral.

Para cuantificar el efecto de las mutaciones ExoI y ExoIII en la acumulación de RNA viral, ésta se analizó mediante RT-qPCR en células BHK-N transfectadas con los cDNAs infectivos. Este tipo celular no es susceptible a la infección por el TGEV, por lo que el nivel de RNA viral es independiente de la producción de virus infectivo. En los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII se observó una reducción en la acumulación de gRNA viral de hasta 15 veces, y de aproximadamente 2 veces en los niveles de sgmRNA-7 (no estadísticamente significativa) en comparación con niveles obtenidos para el cDNA WT (Fig. 33B). Se analizaron además los niveles de acumulación de los intermediarios de polaridad negativa, obteniéndose una

reducción similar a la observada para la cadena de polaridad positiva (Fig. 33B). Reducciones similares en la acumulación de RNA viral se han observado en CoVs mutantes en los dominios ExoN, incluyendo el HCoV-229E, el MHV y el SARS-CoV. Sin embargo, en el caso de los coronavirus del género beta MHV y SARS-CoV los virus mutantes son viables, y las mutaciones introducidas se mantienen establemente en el genoma después de 20 pases en cultivos celulares (Eckerle y col., 2007; Eckerle y col., 2010). Por otra parte, mutantes del rTGEV obtenidos en el laboratorio, en los que la reducción en los niveles de RNA viral era de hasta 10^3 veces con respecto al virus WT, son viables (Zuñiga y col., 2004), lo que sugería que la reducción en la acumulación de RNA no explica el fenotipo letal de los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII.

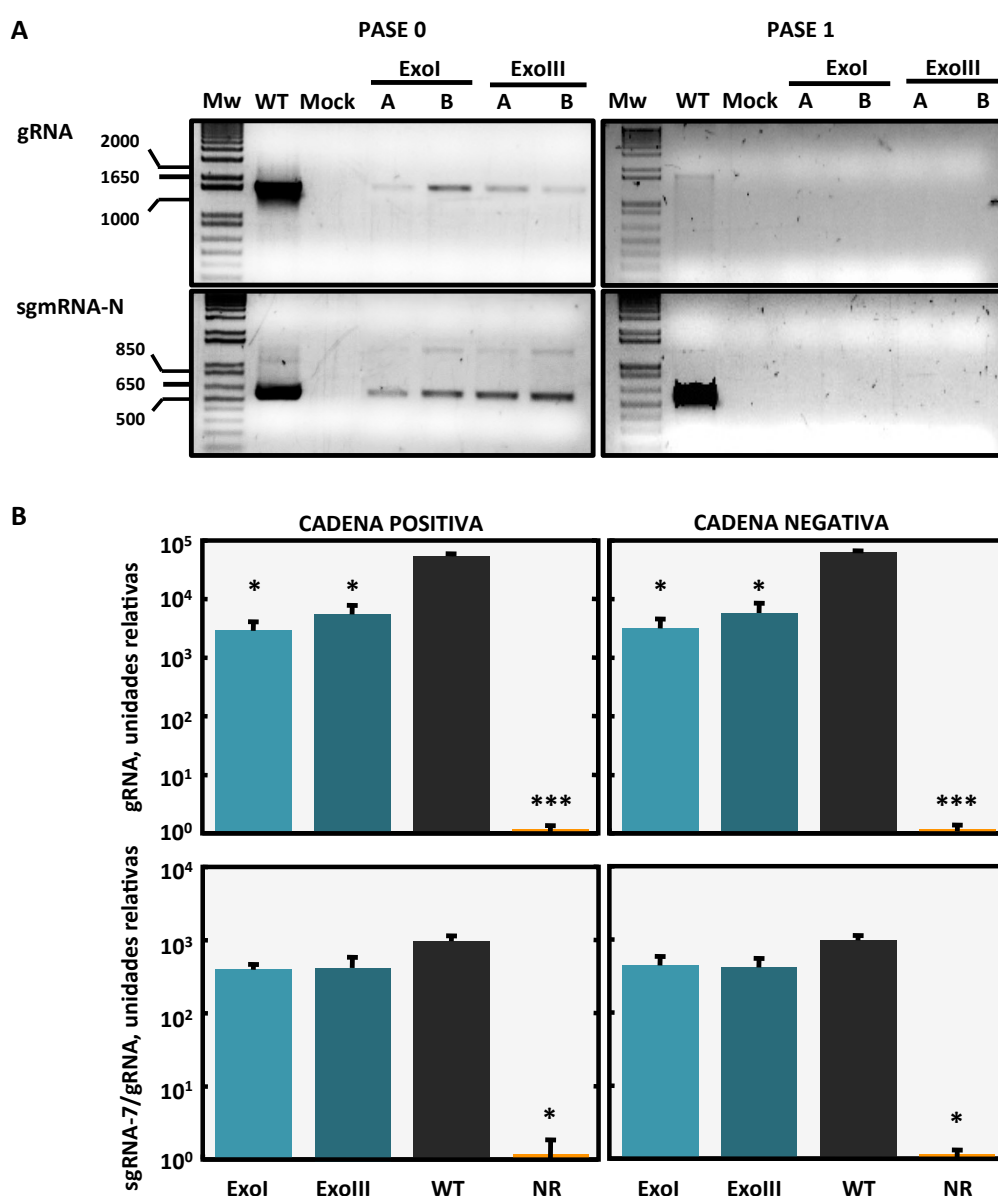


Figura 33. Síntesis de RNA por mutantes del rTGEVs en el centro activo de la actividad ExoN. (A) Análisis mediante RT-PCR de los pases 0 y 1 después de la transfección con los cDNAs infectivos correspondientes a

los rTGEV-ExoI (ExoI) y rTGEV-ExoIII (ExoIII). Se muestran como control células transfectadas sin cDNA (Mock), o con el cDNA infeccioso correspondiente al virus silvestre, rTGEV-WT (WT). Se muestra la amplificación de una región del RNA genómico que incluye la secuencia de la nsp14 (gRNA) y el sgRNA del gen N (sgmRNA-N). Los números a la izquierda indican la masa molecular de los marcadores de tamaño (Mw), en pares de bases. **(B)** Niveles de replicación y transcripción analizados mediante RT-qPCR en células BHK-N transfectadas con los cDNAs correspondientes a los rTGEV-ExoI (ExoI) y rTGEV-ExoIII (ExoIII). Los niveles de replicación (gRNA) y transcripción (sgRNA-7/gRNA) para cada mutante y el replicón parental (WT) se hicieron relativos a los del control no replicativo (NR), al que se dio el valor 1. El análisis se realizó 24 hpt y se evaluaron los niveles de acumulación de la cadena positiva (paneles a la izquierda), y los de la cadena negativa (paneles a la derecha) mediante ensayos TaqMan específicos. Se representa la media de cuatro transfecciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. *, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01; ***, p-valor < 0.001.

Debido al papel de la proteína nsp14 en la síntesis del 5'cap, se analizó si la ausencia de virus infecciosos era causada por una reducción en la acumulación de proteínas virales. Se transfectaron células BHK-N con los cDNAs infecciosos y se analizó la acumulación de proteínas virales mediante *Western blot*. Se detectó la acumulación de proteína nsp3, que se traduce directamente a partir del gRNA viral, para el que se observó una reducción significativa mediante RT-qPCR. Los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII acumulaban la proteína nsp3 de forma comparable al rTGEV-WT (Fig. 34), lo que sugirió que la síntesis de proteínas no estaba afectada en los mutantes. Las proteínas estructurales del virus no se pudieron detectar, ni siquiera en las transfecciones con el cDNA WT (datos no mostrados), probablemente debido a la baja eficiencia de transfección de los BACs. Estos resultados son compatibles con estudios bioquímicos que demuestran que las mutaciones ExoI y ExoIII en la proteína nsp14 del SARS-CoV no disminuyen la actividad N7-MTasa (Chen y col., 2013). Sin embargo, no permitieron explicar el fenotipo letal de los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII.

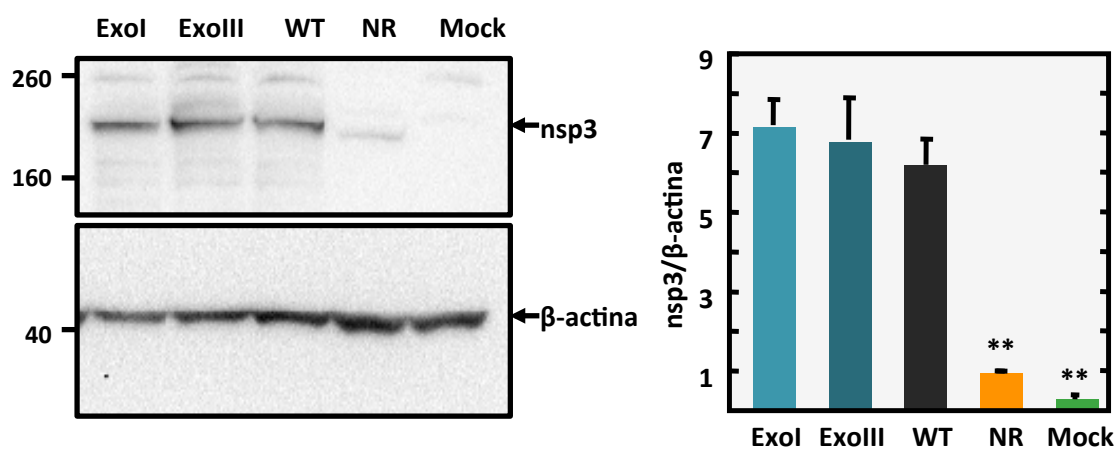


Figura 34. Síntesis de proteínas por mutantes del rTGEV en el centro activo de la actividad ExoN. Detección mediante *Western blot* de las proteínas nsp3 del TGEV (nsp3) y β-actina como control de carga. Se extrajo proteína total de células BHK-N transfectadas con los cDNAs infecciosos correspondientes a los rTGEV-ExoI

(ExoI) y rTGEV-ExoIII (ExoIII). Se muestran como control células transfectadas con el cDNA infectivo correspondiente al virus silvestre, rTGEV-WT (WT), con un cDNA infectivo no replicativo (NR) o sin DNA (Mock). Los números a la izquierda indican la masa molecular en KDa. El análisis se realizó 24 hpt. En el panel de la derecha se representan los niveles de proteína nsp3, normalizados por los de β -actina, estimados mediante densitometría. Los niveles se hicieron relativos a los del control no replicativo, a los que se dio el valor 1. Se representa la media de cuatro transfecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

En conjunto, los resultados indicaron que la actividad ExoN es esencial para el TGEV. En el HCoV-229E las mutaciones ExoI y ExoIII también producen un fenotipo letal mientras que en los betacoronavirus MHV y SARS-CoV los mutantes son viables, a pesar de que en todos los casos se detecta RNA viral (Minskaia y col., 2006; Eckerle y col., 2007; Eckerle y col., 2010). Por lo tanto, el requerimiento de la actividad ExoN podría ser una característica específica del género *Alfacoronavirus*.

6.3. Análisis del requerimiento de la actividad N7-MTasa para la viabilidad del TGEV

La actividad N7-MTasa de la proteína nsp14 de CoV se ha caracterizado mediante complementación genética en levaduras, y se ha demostrado *in vitro*, consiguiéndose la reconstitución de la maquinaria de metilación del 5'cap (Chen y col., 2009; Bouvet y col., 2010; Chen y col., 2013). Sin embargo, el requerimiento de esta actividad en el contexto de la infección por CoV nunca se ha estudiado. Los resultados obtenidos con los replicones del TGEV demostraron que una mutación en la cavidad de unión del cofactor SAM de la proteína nsp14, previamente descrita como supresora de la actividad N7-MTasa, no afectó a la acumulación de RNA viral (Fig. 32). Para analizar el efecto de la actividad N7-MTasa durante la infección del TGEV, esta misma mutación en la proteína nsp14 se introdujo en el clon infectivo del TGEV (Almazan y col., 2000). El virus mutante rTGEV-N7MTasa se rescató después de la transfección de células BHK-pAPN-N, con un título de aproximadamente 10^2 pfu/ml, lo que significaba una reducción de más de 5 unidades logarítmicas con respecto al rTGEV-WT (8.1×10^7 pfu/ml). Además, las placas de lisis presentaron un tamaño muy reducido (datos no mostrados), empezando a ser visibles 4 días después de la infección, lo que sugirió una cinética de crecimiento limitada y retrasada.

La expresión de proteínas por el mutante rTGEV-N7MTasa se analizó mediante inmunofluorescencia de células ST infectadas, detectando la expresión de las proteínas virales nsp14 y N a diferentes tiempos después de la infección. A 8 hpi, el patrón de las proteínas virales en las células infectadas con el rTGEV-N7MTasa era diferente al del virus

parental. La proteína nsp14, y especialmente la proteína N, se localizaron formando grandes acúmulos en el citoplasma de las células infectadas con el virus rTGEV-N7MTasa (Fig. 35), mientras que en el caso del virus rTGEV-WT la marca formaba un patrón perinuclear punteado en el caso de la proteína nsp14, característico de las proteínas del RTC en células infectadas con el TGEV (Prentice y col., 2004; Nogales y col., 2012), o se extendía uniformemente por todo el citoplasma en el caso de la proteína N (Fig. 35). Esta observación podía ser consistente con una cinética de crecimiento retrasada en el mutante rTGEV-N7MTasa. A 16 hpi, la marca correspondiente a la proteína nsp14 presentaba un patrón punteado y la proteína N se encontraba dispersa por el citoplasma en ambos casos (Fig. 35), si bien la se observaba una mayor colocalización entre la proteínas nsp14 y N en el caso del mutante rTGEV-N7MTasa que estaba de acuerdo con una cinética de crecimiento retrasada.

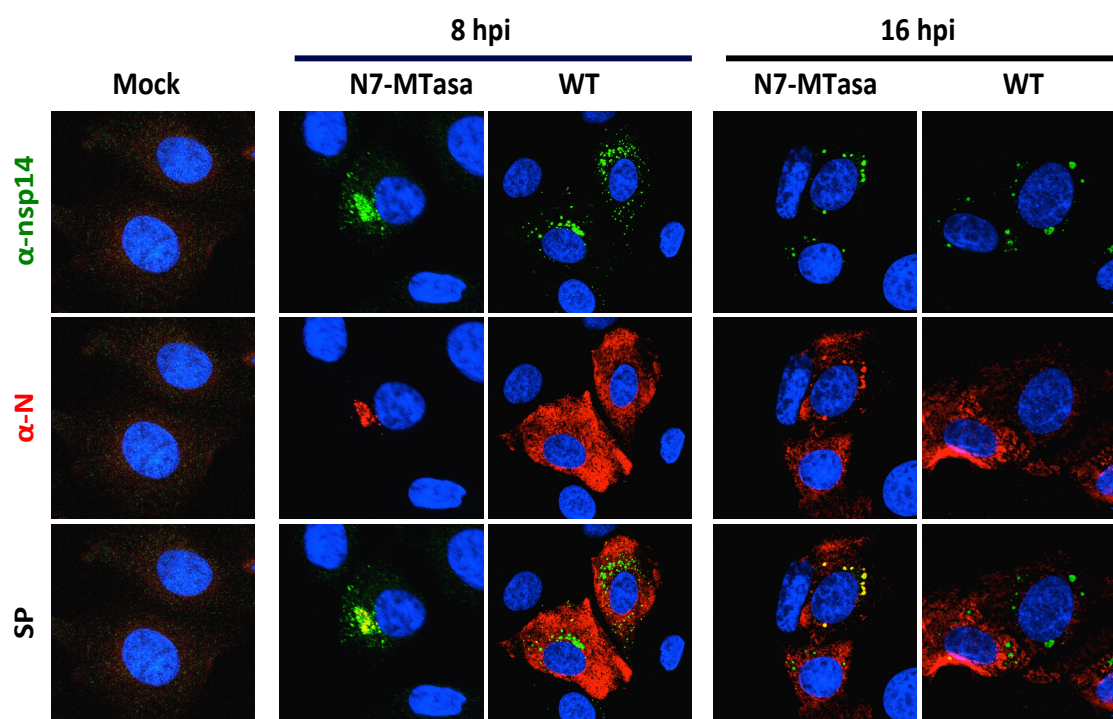


Figura 35. Impacto de la mutación en el dominio de unión a SAM de la proteína nsp14 en la síntesis de proteínas virales. Análisis de la expresión de las proteínas virales nsp14 y N mediante inmunofluorescencia. Monocapas de células ST no infectadas (Mock) o infectadas con los rTGEV-N7MTasa (N7-MTasa) o rTGEV-WT (WT) se fijaron 8 ó 16 horas después de la infección (hpi). Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para las proteínas del TGEV nsp14 (verde) y N (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). SP indica la superposición de los canales rojo, verde y azul.

El rescate del mutante rTGEV-N7MTasa indicó que la actividad N7-MTasa no era esencial para la viabilidad del virus aunque su importancia en la síntesis del 5'cap afectó dramáticamente al ciclo viral. A pesar de que el mutante rTGEV-N7-MTasa se rescató, y se obtuvieron clones aislados por formación de placas de lisis en medio semisólido que presentaban la secuencia mutante, se observó una rápida reversión del fenotipo y de la secuencia. Los virus revertientes se impusieron rápidamente en la población viral en pase 1. La secuenciación de diferentes poblaciones identificó distintos tipos de reversiones, a la secuencia parental o a una secuencia de aminoácidos distinta a la del virus silvestre (Fig. 36). Ensayos bioquímicos publicados con la proteína nsp14 del SARS-CoV (Chen y col., 2013) sugieren que estas mutaciones permitirían recuperar la coordinación de SAM, y por tanto recuperar la función N7-MTasa de la proteína en distinto grado (Fig. 36). Algunos de los revertientes cambiaban la alanina por serina (Fig. 36). Las consecuencias de esta mutación sobre la actividad N7-MTasa no se han analizado *in vitro*, pero debido a su carácter polar, probablemente permita un cierto grado de actividad.

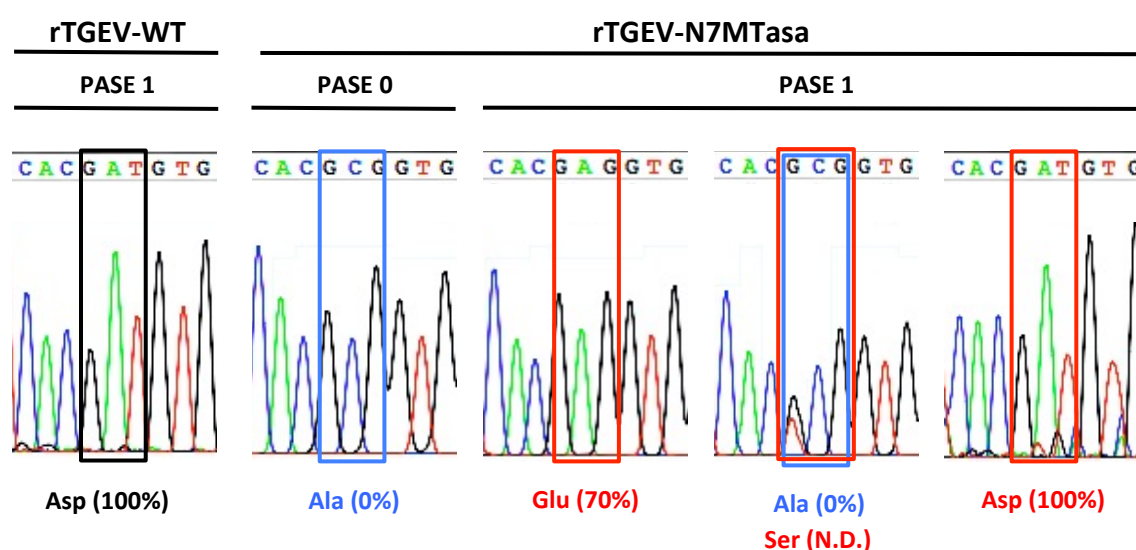


Figura 36. Estabilidad de la mutación en el dominio de unión a SAM de la proteína nsp14. Cromatogramas de las secuencias virales que codifican los aminoácidos 329-331 de la proteína nsp14. Se muestran las secuencias en el virus parental rTGEV-WT en pase 1, y el mutante rTGEV-N7MTasa en pase 0 y pase 1. El recuadro indica el codón del aminoácido 330 en la secuencia de la proteína WT (negro) o la mutante N7-MTasa (azul), o revertientes (rojo). Entre paréntesis se indica el porcentaje de actividad de cada una de las proteínas determinado mediante ensayos de actividad *in vitro* (Chen y col., 2013). N.D., no determinado.

6.4. Generación de virus rTGEV mutantes en el dominio ZF1 de la proteína nsp14

Para estudiar el papel del ZF1 de la proteína nsp14 en el contexto de la infección viral, las mutaciones ZF-H y ZF-C (Fig. 31) se introdujeron en el clon infectivo del TGEV (Almazan y col., 2000). Los cDNAs mutantes se transfectaron en células BHK-pAPN-N y, después de una incubación de 6 horas, estas células se sembraron sobre monocapas de células ST siguiendo los protocolos estándar establecidos en el laboratorio (Almazan y col., 2008). Como se esperaba, los mutantes rTGEV-ZF-H no se rescataron, probablemente debido a defectos en la síntesis de RNA dado que, de forma similar a lo que se observó con el sistema del replicón, no se detectó acumulación de sgRNA-7 en células transfectadas con el cDNA infectivo (datos no mostrados). Estos resultados demostraron la relevancia del ZF1 en la infección viral, y estaban de acuerdo con datos previos, en los que la mutación de dos de los residuos implicados en la coordinación de Zn^{2+} en este motivo ZF1 de la proteína nsp14 del MHV resultaban letales (Eckerle y col., 2006). Por el contrario, el virus rTGEV-ZF-C se rescató eficientemente a partir del clon infectivo con un título de 5.3×10^7 pfu/ml, similar al del virus rTGEV-WT (6.7×10^7 pfu/ml). Las mutaciones introducidas se detectaron después de 10 pases en cultivos celulares en todos los clones virales estudiados (datos no mostrados), indicado que los virus rTGEV-ZF-C eran estables.

6.4.1. Caracterización del virus mutante en el motivo ZF1 de la proteína nsp14 (rTGEV-ZF-C) en cultivos celulares

En la infección con el virus rTGEV-ZF-C, el efecto citopático apareció de forma retrasada con respecto al que produjo el virus parental (datos no mostrados). De acuerdo con este menor efecto citopático, el tamaño de las placas de lisis generadas por el virus rTGEV-ZF-C fue significativamente menor (Fig. 37A). Esta reducción en el tamaño de placa se observó en el virus sin clonar, procedente del pase 0 después de la transfección, y en 6 clones individuales aislados de cada uno de los virus, mutante y parental. Para determinar si la mutación ZF-C afectaba al crecimiento del virus en cultivos celulares, la cinética de crecimiento del virus mutante se analizó en células ST infectadas a baja (0.05 pfu/célula) o alta (5 pfu/célula) moi. El título del virus rTGEV-ZF-C fue mayor que el del virus rTGEV-WT a tiempos cortos después de la infección, alcanzándose diferencias de hasta 10 veces a 12 hpi (Fig. 37B). Estas diferencias desaparecieron a tiempos largos, alcanzándose títulos máximos similares en ambos virus (Fig. 37B).

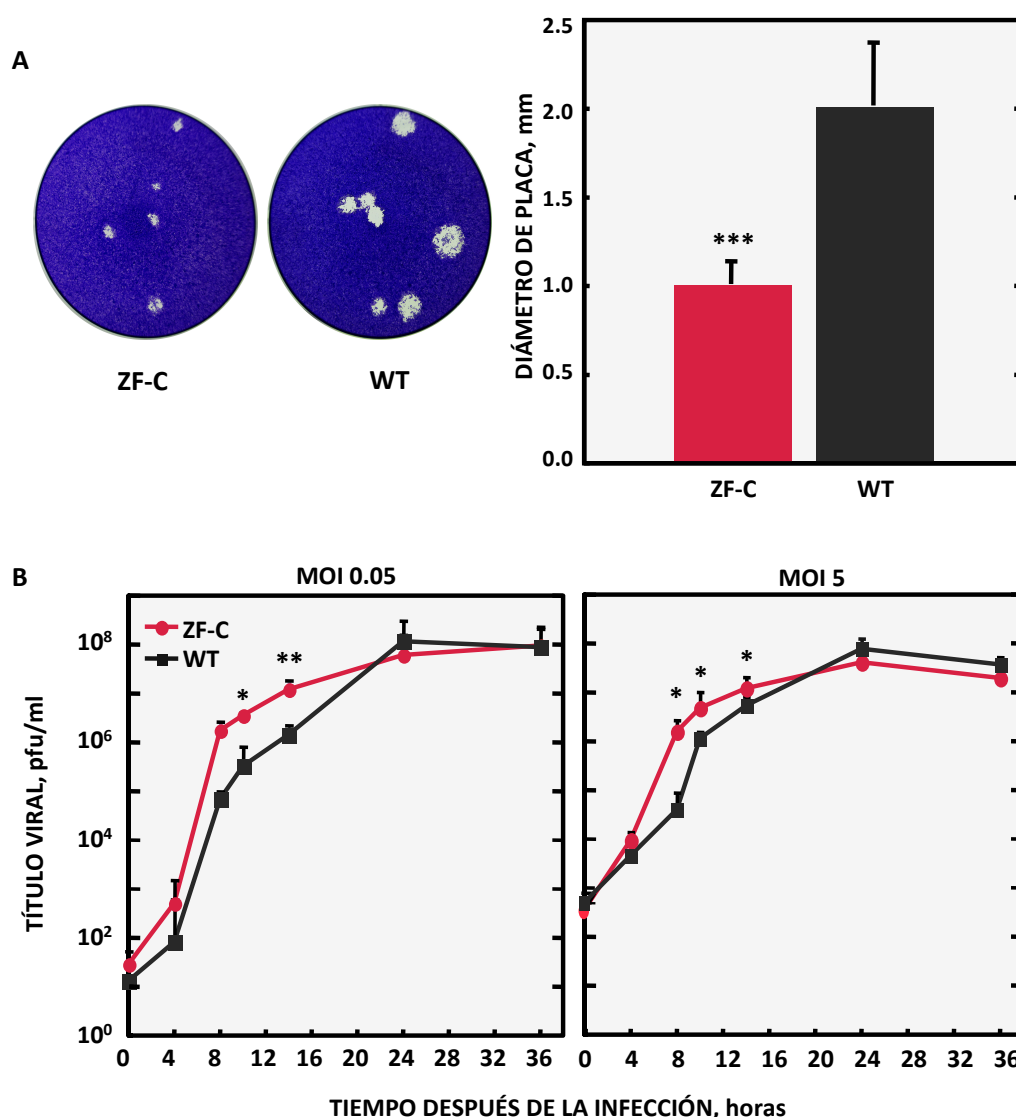


Figura 37. Crecimiento del virus mutante rTGEV-ZF-C en cultivos celulares. (A) Placas de lisis producidas por el rTGEV-ZF-C (ZF-C) y el rTGEV-WT (WT) en células ST. Las células se cubrieron con medio semisólido, se fijaron con formaldehído, y se tiñeron con cristal violeta 48 hpi. En el panel de la derecha se representa el tamaño medio de diez placas de lisis individuales de los virus rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) y rTGEV-WT (WT, negro). Las barras de error representan la desviación estándar. **(B)** Cinética de crecimiento del rTGEV-ZF-C. Se infectaron células ST con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) y rTGEV-WT (WT, negro) a moi 0.05 (panel izquierdo) o 5 (panel derecho). Se recogió sobrenadante de los cultivos a distintos tiempos después de la infección, y se tituló en células ST. Para cada punto se representa la media de tres infecciones independientes, tituladas por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. *, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01; ***, p-valor < 0.001.

La cinética de acumulación de gRNA viral se analizó en células ST infectadas con los virus rTGEV-ZF-C y rTGEV-WT. A tiempos tempranos después de la infección, correspondientes con la síntesis activa de RNA durante la infección por el TGEV, los niveles de acumulación de gRNA fueron similares en los virus rTGEV-ZF-C y rTGEV-WT (Fig. 38), de acuerdo con los resultados obtenidos utilizando el sistema del replicón. Sin embargo, a tiempos tardíos

después de la infección, la acumulación de gRNA en las células infectadas por el virus rTGEV-ZF-C era hasta 10 veces menor que en las células infectadas con el virus rTGEV-WT (Fig. 38). En estas condiciones, a estos tiempos después de la infección, se dan re-infecciones. Dado que el título del virus mutante era similar, o incluso superior que el del virus parental, la disminución en la cantidad de gRNA podría atribuirse a una diseminación menos eficiente del virus rTGEV-ZF-C en comparación con el rTGEV-WT. Esta hipótesis está de acuerdo con el menor efecto citopático y la disminución en el tamaño de placa causados por el virus mutante en comparación con el virus silvestre.

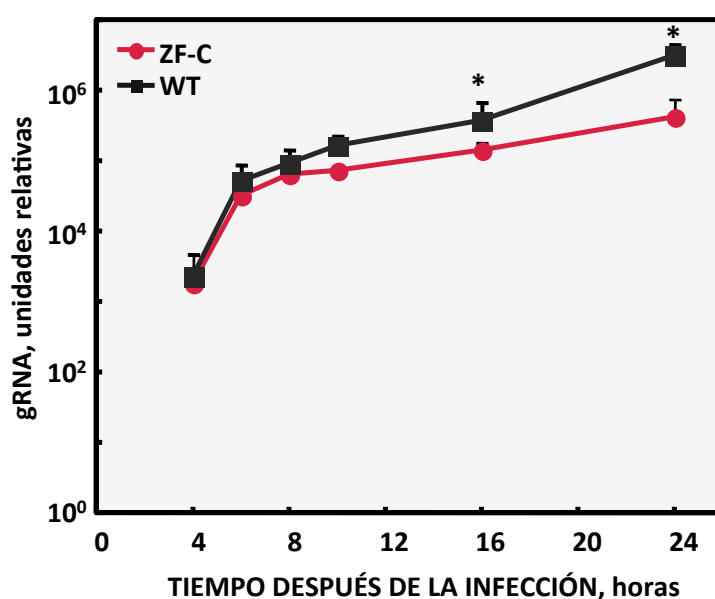


Figura 38. Cinética de acumulación de gRNA viral por el mutante rTGEV-ZF-C. Se infectaron células ST con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro) a moi 1. Se recogió el RNA intracelular a distintos tiempos después de la infección y se evaluó la acumulación de RNA genómico viral (gRNA) mediante RT-qPCR. Los niveles de RNA se normalizaron con los niveles del gen de la beta-glucuronidasa (GUSB), y se expresaron en relación a los niveles obtenidos para células no infectadas. Cada punto representa la media de tres infecciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. *, p-valor < 0.05.

6.4.2. Caracterización de la respuesta antiviral inducida por el virus mutante rTGEV-ZF-C

La principal causa del efecto citopático producido por el TGEV es la muerte celular programada o apoptosis inducida por la infección (Eleouet y col., 1998; Sirinarumitr y col., 1998). La apoptosis inducida por el TGEV es dependiente de la activación de la vía de las caspasas, incluyendo el procesamiento de dos caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9), y tres caspasas efectoras que se encuentran en la base de la ruta (caspasas 3, 6, y 7) (Sirinarumitr y col., 1998; Eleouet y col., 2000; Cruz y col., 2011). Para analizar si el menor efecto citopático, y el fenotipo de la placa de lisis, observados en el virus rTGEV-ZF-C se debían a

una escasa inducción del proceso de apoptosis, la presencia de caspasa-3 activa se evaluó mediante *Western blot* en células infectadas con los virus rTGEV-ZF-C o rTGEV-WT. La caspasa 3 se encuentra en la célula en una forma inactiva (pro-caspasa 3) con una masa molecular propuesta de 32 KDa que es procesada proteolíticamente dando dos subunidades de 17 y 12 KDa que dimerizan formando la forma activa de la enzima. A las 24 hpi, cuando el título de ambos virus era similar, la infección por el virus rTGEV-ZF-C produjo niveles más bajos de caspasa-3 activa que la infección por el virus rTGEV-WT (Fig. 39A). Previamente se ha descrito que la proteína N del TGEV es un sustrato de la caspasa 3 y puede usarse como un indicador del grado de apoptosis producida por la infección (Eleouet y col., 2000). Como consecuencia de la menor activación de la caspasa-3, la forma procesada de la proteína N se observó en el caso de la infección por el rTGEV-WT, pero no en la infección por el mutante rTGEV-ZF-C (Fig. 39B). En conjunto, estos resultados sugirieron que la reducción en el efecto citopático y tamaño de placa inducidos durante la infección con el rTGEV-ZF-C se debió a una disminución en la apoptosis inducida por este virus.

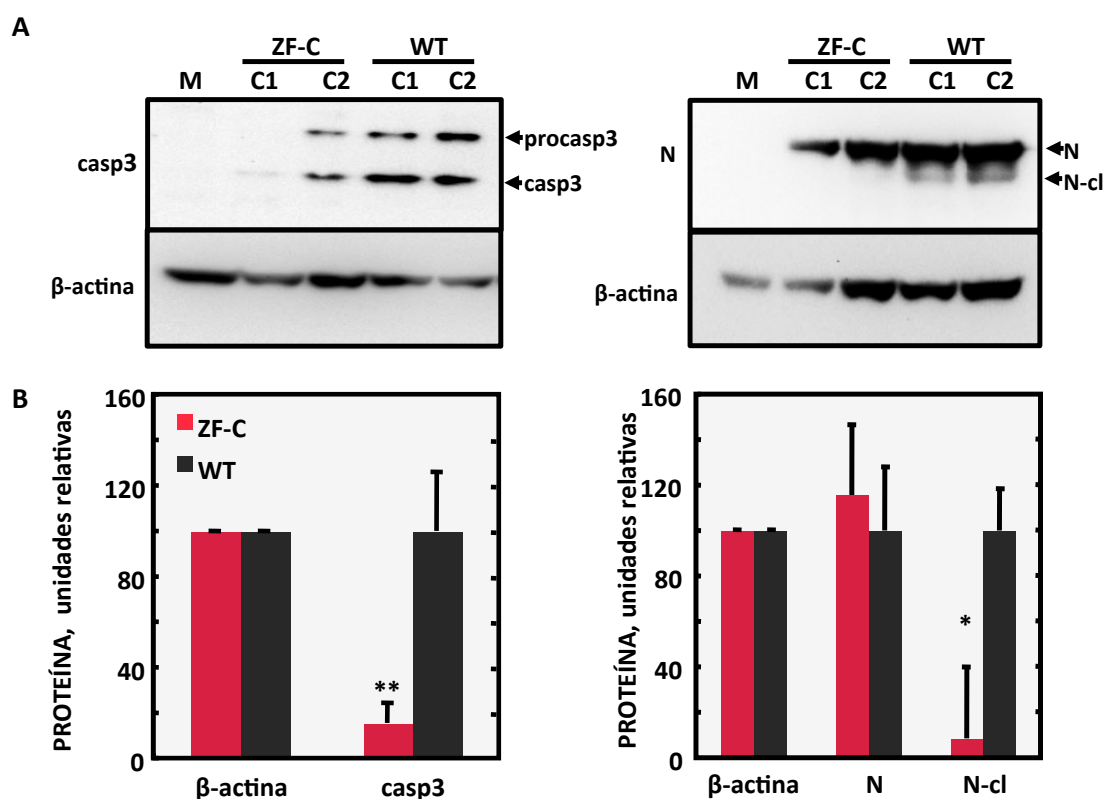


Figura 39. Activación de caspasas durante la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C. (A) Detección mediante *Western blot* de las proteínas caspasa 3 (casp3), N del TGEV (N) y β -actina como control de carga. A las 24 hpi se extrajo proteína total de células ST infectadas con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro) a moi 0.5. C1 y C2 representan dos clones evaluados independientemente. Se indican la procaspasa 3

(procasp3), la forma activa de la caspasa 3 (casp3), la proteína N del TGEV (N) y la forma de la proteína N procesada por caspasas (N-cl). **(B)** Niveles de proteína estimados mediante densitometría. Los valores se normalizaron en relación a los de la β -actina, y se hicieron relativos a los obtenidos con el virus WT, a los que se dio el valor 100. Se presenta la media tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. *, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01.

Datos previos del laboratorio indicaron que la apoptosis inducida por el TGEV estaba relacionada con la respuesta antiviral inducida por la infección (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013). Para determinar si la menor apoptosis inducida por el mutante rTGEV-ZF-C era debida a una menor activación de la respuesta inmune innata se analizó la acumulación de IFN- β y TNF como marcadores de la activación de las rutas de señalización de IRF-3 y NF- κ B, respectivamente, mediante RT-qPCR, en células ST infectadas por el rTGEV-ZF-C y el rTGEV-WT. La infección por el mutante rTGEV-ZF-C indujo niveles de IFN- β y TNF significativamente menores a los producidos por la infección con el virus parental, con reducciones de hasta 25 y 17 veces, respectivamente (Fig. 40). lo que indicó una menor activación de la respuesta antiviral. Estos datos indicaron que el virus mutante rTGEV-ZF-C produjo una menor activación de la respuesta antiviral en comparación con el virus rTGEV-WT.

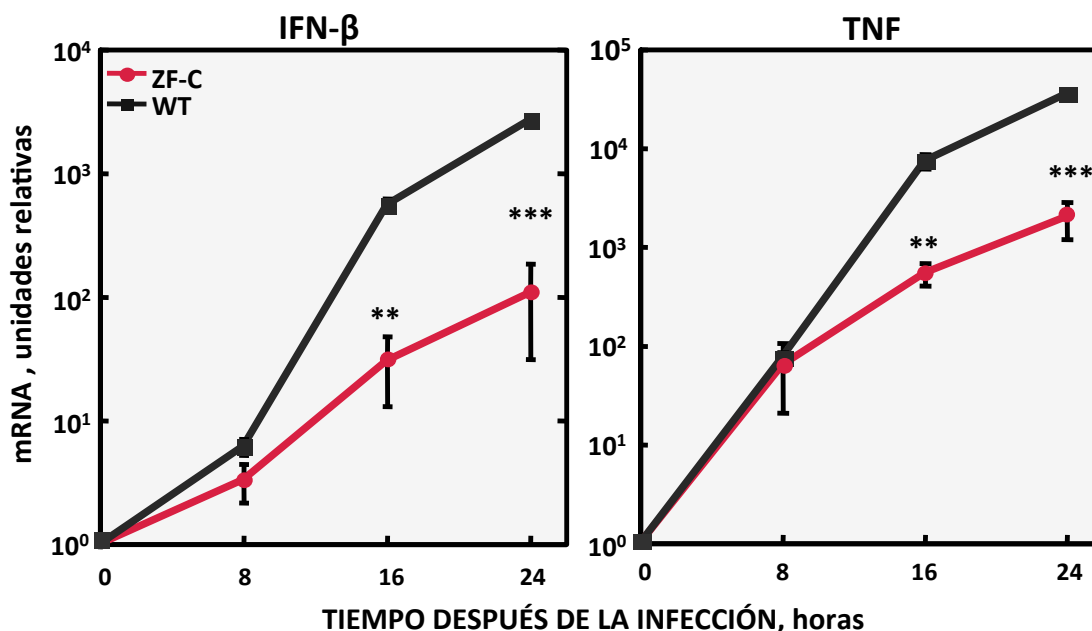


Figura 40. Inducción de la respuesta inmune innata en la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C. Se infectaron células ST con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro) a moi 1. Se recogió el RNA intracelular a distintos tiempos después de la infección y se evaluó la acumulación de los mRNAs de interferón β (IFN- β) y factor de necrosis tumoral (TNF) mediante RT-qPCR. Los niveles de RNA se normalizaron con los niveles del gen GUSB, y se expresaron en relación a los niveles obtenidos para células no infectadas, a las que se dio el valor 1. Cada punto representa la media de cuatro infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. **, p-valor < 0.01; ***, p-valor < 0.001.

En la respuesta inmune innata frente a virus, la señalización mediada por IFN induce la expresión de un grupo de moléculas efectoras de la respuesta antiviral, conocidos como genes de respuesta a IFN (ISGs) (Schneider y col., 2014). La acumulación del mRNA de un conjunto de ISGs en células infectadas con los virus rTGEV-ZF-C y rTGEV-WT se analizó mediante RT-qPCR. Los ISGs evaluados fueron el factor regulador de interferón I (IRF-1), la OAS, y los sensores citoplasmáticos RIG-I y MDA5. Estas ISGs se seleccionaron basándonos en datos previos del laboratorio que demostraban su implicación en la respuesta antiviral frente al TGEV (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013). De acuerdo con la disminución en los niveles de IFN- β , se observó una reducción de la acumulación del mRNA de todos los ISGs analizados en las células infectadas con el rTGEV-ZF-C, en comparación con las células infectadas con el rTGEV-WT (Fig. 41). Por el contrario, no se detectaron cambios significativos en los niveles del mRNA del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Fig. 41). Este factor está implicado en la respuesta inmune y su expresión no varía en la infección con el TGEV (Cruz y col., 2013). Este resultado permitió descartar que la reducción observada en los niveles de ISGs se debiese a una disminución general de la transcripción durante la infección con el rTGEV-ZF-C.

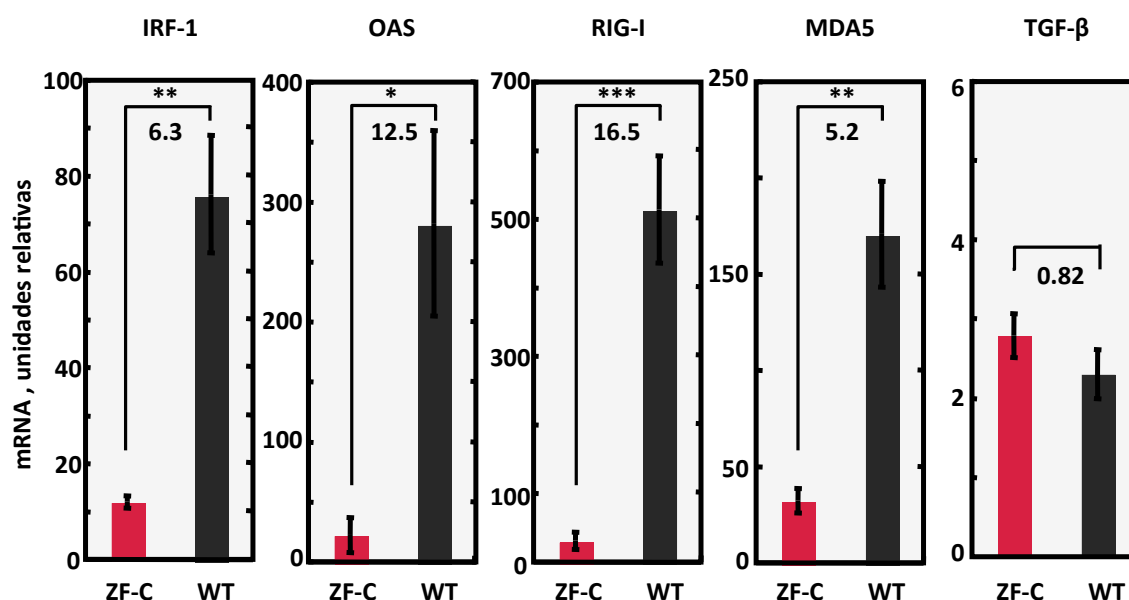


Figura 41. Inducción de la expresión de genes estimulados por interferón (ISGs) en la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C. Se infectaron células ST con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro) a moi 1. Se recogió el RNA intracelular a 16 hpi y se evaluó mediante RT-qPCR la acumulación de los mRNAs de las ISGs IRF-1, OAS, RIG-I y MDA5, y TGF- β como control del experimento. Los niveles de RNA se normalizaron con los niveles del gen GUSB, y se expresaron en relación a los niveles obtenidos para células no infectadas, a las que se dio el valor 1. Se indica el número de veces de reducción en los niveles de expresión en las células infectadas con el rTGEV-ZF-C en relación al rTGEV-WT. Para cada punto se representa la media de cuatro

infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. *, p-valor < 0.05 **, p-valor < 0.01; ***, p-valor < 0.001.

6.4.3. Acumulación de dsRNA en células infectadas por el virus mutante rTGEV-ZF-C

La producción de IFN y citoquinas proinflamatorias en respuesta a dsRNA en células no inmunes está mediada principalmente por la activación de los receptores citoplasmáticos RIG-I y MDA5 (Husser y col., 2011; Zust y col., 2011; Menachery y col., 2014). Estos sensores se activan por el reconocimiento de dsRNAs y promueven la activación de los factores de transcripción IRF-3 y NFκB, los cuales se translocan al núcleo donde activan la expresión de IFN de tipo I y de citoquinas proinflamatorias (Jensen y Thomsen, 2012). Teniendo en cuenta la actividad ExoN de la proteína nsp14, y el fenotipo del mutante rTGEV-ZF-C, la inducción de una respuesta inmune innata reducida podría ser consecuencia de una disminución en los niveles de dsRNA que activan la respuesta antiviral. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la acumulación de dsRNA en células ST sincronizadas infectadas con los virus rTGEV-ZF-C o rTGEV-WT. Para ello, se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo que reconoce moléculas de dsRNA de más de 40 bp de longitud independientemente de su secuencia (Weber y col., 2006). Además, se determinó la localización subcelular de la proteína nsp14, para analizar el efecto de la mutación en el motivo ZF1 en su acumulación y distribución intracelular. En las células infectadas, la proteína nsp14-ZF-C mostró un patrón similar al observado para la proteína WT (Fig. 42A). Este patrón vesicular con una distribución perinuclear, fue similar al observado para otras proteínas del RTC (Prentice y col., 2004; Nogales y col., 2012). A tiempos tempranos después de la infección no se detectaron diferencias en la distribución del dsRNA en las infecciones con los virus rTGEV-ZF-C y rTGEV-WT, observándose un alto grado de colocalización entre la nsp14 y el dsRNA, que correspondía muy posiblemente a los lugares de síntesis activa de RNA (Fig. 42A). A tiempos tardíos después de la infección por el rTGEV-WT la marca correspondiente al dsRNA se distribuyó de forma uniforme por el citoplasma de las células infectadas (Fig. 42A), como se había descrito previamente en infecciones con varios CoVs (Knoops y col., 2008; Sola y col., 2011). Por el contrario, en las células infectadas con el rTGEV-ZF-C, la marca producida por el dsRNA continuaba concentrada en gránulos perinucleares definidos (Fig. 42A).

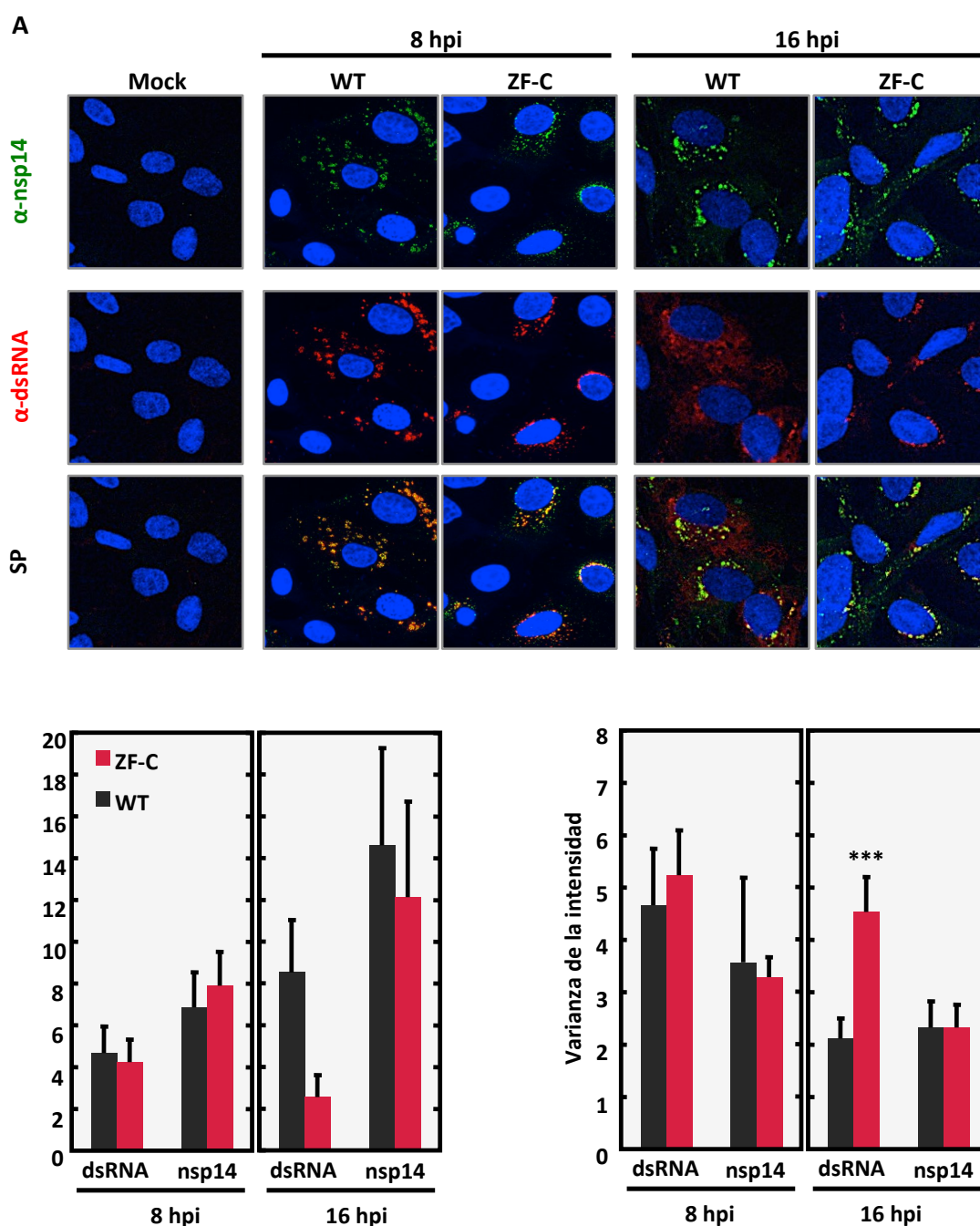


Figura 42. Acumulación de dsRNA en células infectadas con el virus mutante rTGEV-ZF-C. Monocapas de células ST sincronizadas no infectadas (Mock) o infectadas con los virus rTGEV-ZF-C (ZF-C) o rTGEV-WT (WT) a moi 1 se fijaron 8 ó 16 hpi. Se realizaron dobles marcajes utilizando anticuerpos específicos para la proteína nsp14 del TGEV (verde) o el dsRNA (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **(A)** Imágenes de microscopía confocal de campos representativos de cada condición analizada. SP indica la superposición de los canales rojo, verde y azul. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por célula y de la desviación estándar normalizada de la intensidad de fluorescencia (varianza de la intensidad) correspondientes a la señal de la nsp14 y el dsRNA en las infecciones con los virus rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro). Se representa la media de 30 células independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. ***, p -valor < 0.001

Para cuantificar estas diferencias se realizó un análisis no sesgado de las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas, midiendo en células individuales la intensidad de la fluorescencia correspondiente a las marcas de la proteína nsp14 y del dsRNA, así como la varianza normalizada en la intensidad de estas señales. La medida de la varianza es indicadora de la distribución de la señal, dado que en el caso de una señal uniforme la varianza es mínima mientras que su valor aumenta cuando la señal es irregular (Iborra y Buckle, 2008). En las muestras correspondientes a 8 hpi no se observaron diferencias significativas entre los virus (Fig. 42B). En cambio, a 16 hpi la intensidad de la señal correspondiente al dsRNA fue significativamente menor en las células infectadas con el rTGEV-ZF-C que en las infectadas con el rTGEV-WT (Fig. 42B). Es más, la varianza normalizada fue significativamente superior en el caso de la infección con el rTGEV-ZF-C en comparación con la correspondiente al rTGEV-WT (Fig. 42B), lo que ilustró la existencia de una diferencia entre la señal difusa observada en el caso de la infección por el rTGEV-WT y la concentración de la señal en las células infectadas por el rTGEV-ZF-C. Este resultado sugirió que la proteína nsp14-ZF-C interfería con la acumulación de dsRNA a tiempos tardíos después de la infección, lo que podría causar la reducida respuesta antiviral inducida por el virus rTGEV-ZF-C.

6.4.4. Modulación de la respuesta inmune innata por la proteína nsp14-ZF-C

La reducida acumulación de dsRNA observada a tiempos tardíos después de la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C era compatible con la hipótesis de que este virus inhibiese activamente la acumulación de dsRNA y, como consecuencia, la activación de la respuesta antiviral subsiguiente. Para evaluar el potencial del rTGEV-WT y el rTGEV-ZF-C en la inhibición de la respuesta antiviral mediada por dsRNA, la respuesta antiviral se activó mediante la adición de dsRNA exógeno, y se evaluó la respuesta inmune innata en el contexto de la infección viral.

En una primera aproximación, se infectaron células ST con cada uno de los virus y, después de 12 horas de infección, las células infectadas se transfectaron con el análogo de dsRNA poly (I:C). A 4 hpt, se evaluaron mediante RT-qPCR la acumulación de gRNA viral, así como la acumulación de los mRNAs del IFN- β y del TNF, como marcadores de la inducción de la respuesta antiviral. En ausencia de poly (I:C), y de acuerdo a nuestros resultados anteriores, la producción de IFN- β y TNF fue significativamente menor en las células infectadas con el mutante rTGEV-ZF-C, en comparación con las infectadas con el rTGEV-WT

(Fig. 43). La acumulación de gRNA fue similar en presencia y ausencia de poly (I:C), indicando que el tratamiento con poly (I:C) no afectó significativamente al crecimiento viral (Fig. 43). La infección con el rTGEV-WT combinada con el tratamiento con poly (I:C) indujo una respuesta exacerbada, como se esperaba debido a la acción conjunta de la infección y el análogo de dsRNA poly (I:C) (Fig. 43). En cambio, esta respuesta se redujo significativamente en el caso de la infección con el rTGEV-ZF-C, a pesar de la activación con dsRNA exógeno (Fig. 43).

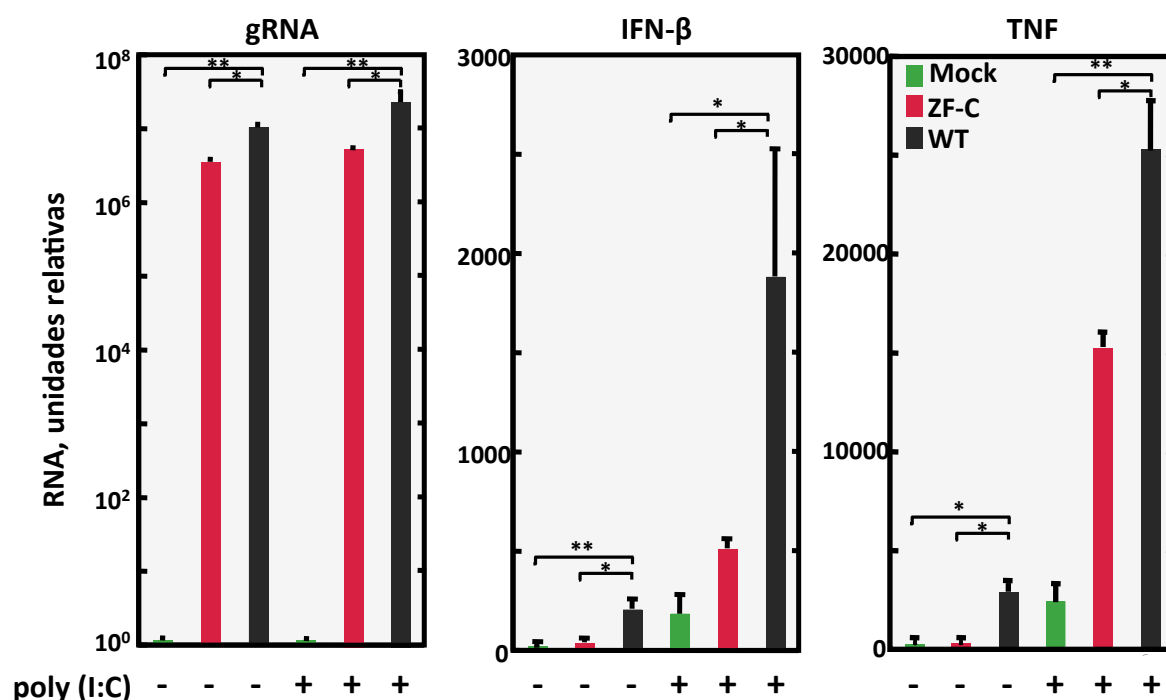


Figura 43. Inducción de la respuesta antiviral en células infectadas con el virus mutante rTGEV-ZF-C con dsRNA exógeno. Células ST no infectadas (Mock, verde) o infectadas con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro) a moi 1 se transfectaron, con 1.33 μ g de poly (I:C) por millón de células 12 hpi. Se recogió el RNA intracelular a 16 hpi (4 hpt) y se evaluó la acumulación de gRNA viral y de los mRNAs de interferón β (IFN- β) y factor de necrosis tumoral (TNF) mediante RT-qPCR. Los niveles de RNA se normalizaron con los niveles del gen GUSB, y se expresaron en relación a los niveles obtenidos para células no infectadas, a los que se dio el valor 1. Cada condición experimental representa la media de tres infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. *, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01.

En una aproximación complementaria, para evaluar si la infección con el rTGEV-ZF-C modulaba la respuesta inducida por el rTGEV-WT, se llevaron a cabo co-infecciones con ambos virus. Células ST se infectaron con diferentes dosis de cada virus, y se analizaron los niveles de gRNA y de los mRNAs de IFN- β y TNF a 16 hpi. En las infecciones individuales se obtuvo una ligera diferencia en la acumulación de gRNA entre los virus rTGEV-ZF-C y rTGEV-

WT (Fig. 44A). Esta diferencia, como se había mostrado previamente, no influyó en el título viral. Sin embargo, esta diferencia no se observó en las co-infecciones por ambos virus (Fig. 44A).

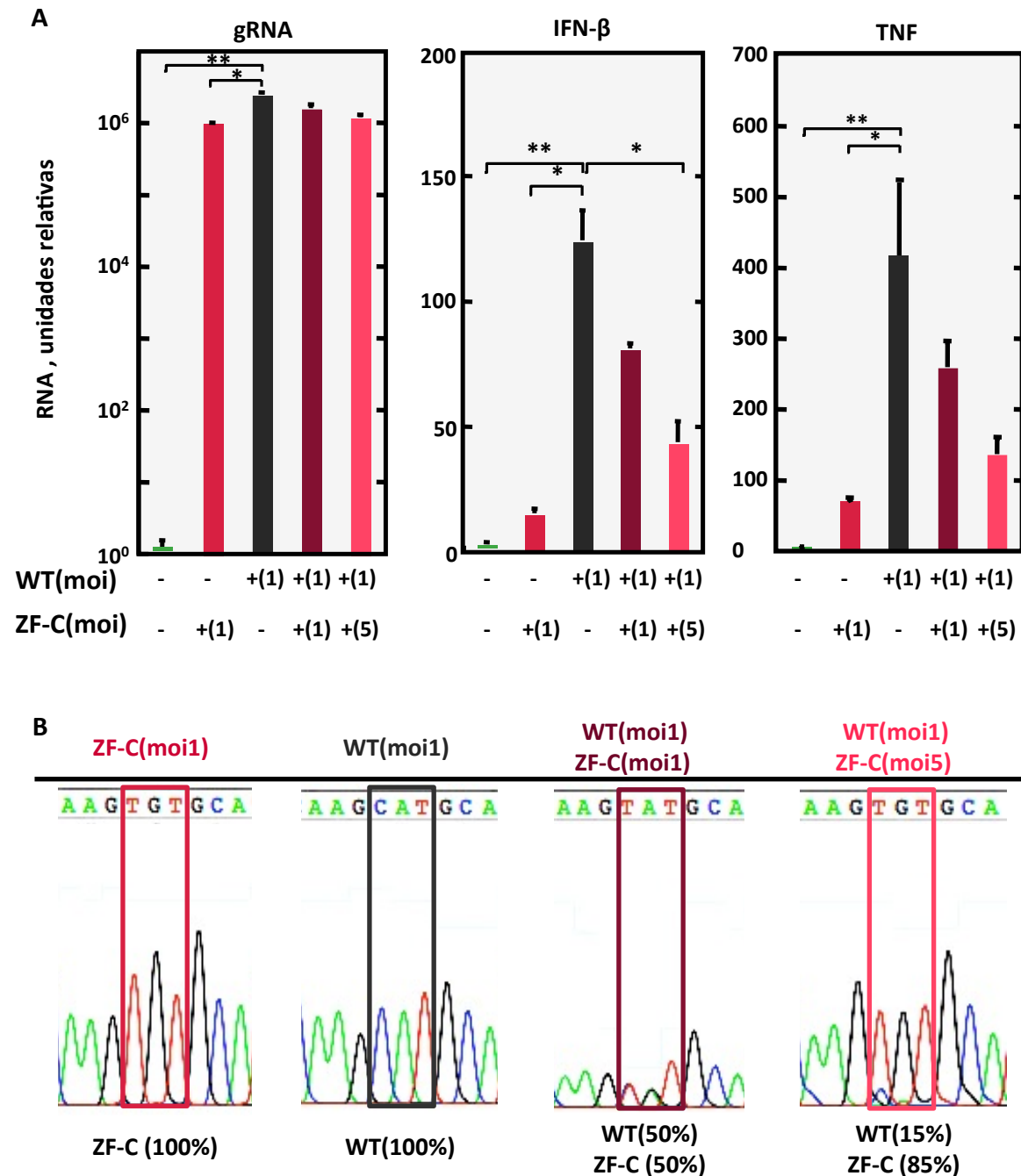


Figura 44. Modulación de la respuesta antiviral inducida en células infectadas con el rTGEV-WT por la infección con el virus mutante rTGEV-ZF-C. Se infectaron células ST con los rTGEV-ZF-C (ZF-C, rojo) o rTGEV-WT (WT, negro) a moi 1, o se co-infectaron con una moi 1 de cada uno de los virus (rojo oscuro), o una moi 5 rTGEV-ZF-C y una moi 1 del rTGEV-WT (rosa). Se recogió el RNA intracelular 16 hpi. **(A)** Se evaluó la acumulación de gRNA viral y de los mRNAs de IFN-β y TNF mediante RT-qPCR. Los niveles de RNA se normalizaron con los niveles del gen GUSB, y se expresaron en relación a los niveles obtenidos para células no infectadas (Mock, verde), a los que se dio el valor 1. Para cada condición experimental se representa la media de dos infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. *, p-valor < 0.05; **, p-

valor < 0.01. **(B)** Cromatogramas de las secuencias virales que codifican los aminoácidos 227 a 229 de la proteína nsp14. El recuadro indica el codón mutado en el mutante rTGEV-ZF-C correspondientes a la mutación ZF-C. En la parte superior se indican las condiciones de infección, y en la parte inferior una estimación, mediante la comparación de la altura de los picos, de las proporciones de cada virus en el momento del análisis.

Para descartar un efecto debido a posibles diferencias en la cinética de crecimiento que llevasen a que uno de los virus se impusiese en la población, la proporción de cada virus se estimó mediante la secuenciación de la región de la proteína que contenía la mutación, comprobándose que la proporción de cada virus utilizada en el momento de la inoculación se mantuvo a las 16 hpi (Fig. 44B). La co-infección en proporción 1:1 disminuyó los niveles de IFN- β y TNF en comparación a los niveles inducidos por la infección con la misma dosis del rTGEV-WT (Fig. 44A). Es más, la acumulación de mRNA de IFN- β y TNF se redujo aún más cuando la dosis del rTGEV-ZF-C excedía en 5 veces a la del rTGEV-WT (Fig. 44A). Este resultado sugirió que la proteína nsp14-ZF-C podía estar actuando en *trans*, reduciendo los niveles de dsRNA producidos durante la infección con el rTGEV-WT y, como consecuencia, reduciendo la respuesta antiviral inducida.

En conjunto, los datos obtenidos indicaron que el rTGEV-ZF-C indujo una disminución en la acumulación de dsRNA, tanto en el producido durante la infección como el añadido exógenamente. Ello nos permitió concluir por primera vez que la proteína nsp14 de CoVs influye en la modulación de la respuesta antiviral.

DISCUSIÓN

El mecanismo de expresión génica de los CoVs mediante la generación de sgRNAs hace que estos virus sean sistemas de expresión de genes heterólogos prometedores para su uso en vacunas y terapia génica. Además, el hecho de que los CoVs infecten mucosas e induzcan inmunidad secretora les confiere una ventaja adicional para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, la limitada estabilidad de los vectores basados en el genoma de CoVs supone un importante inconveniente para su implementación en el desarrollo de vacunas (Enjuanes y col., 2007; Bentley y col., 2013). Durante esta tesis se estudió la estabilidad de los vectores basados en el genoma del TGEV tomando como modelo la expresión de antígenos del PRRSV, y se diseñaron estrategias para el desarrollo de vectores estables. Se determinó que la expresión de pequeños dominios inmunológicamente relevantes o la expresión de epítomos utilizando como matriz una proteína establemente expresada por vectores basados en el genoma del rTGEV, eran estrategias útiles para aumentar la estabilidad de los vectores derivados de CoVs. Por otra parte, con el fin de encontrar nuevas estrategias de atenuación de CoVs, se estudió el papel de la proteína nsp14 durante la infección. Los resultados de este trabajo han conducido a la demostración de una nueva función de la proteína nsp14 que actúa como antagonista de la respuesta inmune innata.

1. ESTABILIDAD DE VECTORES BASADOS EN EL GENOMA DE CoVs

La introducción de secuencias heterólogas en un vector de expresión frecuentemente provocan la inestabilidad del vector. Los fenómenos de recombinación, tanto homóloga como no homóloga dan lugar a la pérdida de la expresión del gen heterólogo. En el caso de vectores bacterianos, se han generado cepas de bacterias en las que se han inactivado distintos genes implicados en el proceso de recombinación, como las cepas RecA⁻ de *E. coli* que mantienen los genes heterólogos más eficientemente (Anderson y Roth, 1977). En el caso de los vectores virales, especialmente en los basados en virus de RNA de polaridad positiva, la inestabilidad es un fenómeno frecuente. Esto se debe a la alta tasa de recombinación, que lleva a la pérdida de los genes heterólogos, impidiendo su expresión durante periodos prolongados (Figlerowicz y col., 2003; Alejska y col., 2005; Paar y col., 2009).

En el caso de los vectores basados en el genoma de CoVs, virus de RNA de polaridad positiva y con una alta frecuencia de recombinación (Sanchez y col., 1992; Lai, 1996;

Denison y col., 2011), la inestabilidad es un fenómeno muy frecuente. De hecho, es habitual la aparición de variantes naturales en las que se pierde la expresión de los genes específicos de grupo (Luytjes, 1995). La pérdida de estas secuencias también se ha documentado en cultivos celulares, dado que estos genes no son esenciales para la replicación de CoVs (Schwarz y col., 1990; Herrewegh y col., 1995). Con respecto al uso de los CoVs como vectores, se han descrito fenómenos de inestabilidad en todos los CoVs que han sido utilizados como vectores de expresión, tales como el TGEV, el MHV y el IBV (Sola y col., 2003; de Haan y col., 2005; Cruz y col., 2010; Bentley y col., 2013). En este último caso, también se ha observado la pérdida de los genes heterólogos cuando la estabilidad se estudió *in vivo* (Bentley y col., 2013). Aún así, se conocen algunos ejemplos de proteínas cuya expresión a partir de vectores derivados de CoVs se mantiene a lo largo de los pases. La GFP representa uno de estos ejemplos. De hecho, su expresión en cultivos celulares por vectores basados en el genoma del MHV o del TGEV se detectó hasta el pase 6 o el 20, respectivamente (Sarma y col., 2002; Sola y col., 2003). Asimismo, la estabilidad de la proteína M del PRRSV expresada por vectores derivados del TGEV es muy alta, como se muestra en esta tesis. Sin embargo los vectores derivados del IBV que expresan la GFP resultaron inestables (Bentley y col., 2013). En el caso de proteínas como la luciferasa expresada por vectores basados en el genoma de MHV o IBV (de Haan y col., 2005; Bentley y col., 2013), la β -glucuronidasa expresada a partir de minigenomas basados en el TGEV (Alonso y col., 2002), y las proteínas GP5 (Cruz y col., 2010), GP4 (mostrada en esta memoria) y GP3 del PRRSV, o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) expresadas por vectores basados en el TGEV (datos no publicados), la expresión de los genes heterólogos se perdió en pocos pases en cultivos celulares. En nuestra experiencia utilizando vectores basados en el genoma del TGEV, menos del 20% de los genes insertados en el genoma de este CoV se conservan establemente durante más de 8 pases en cultivos celulares. La mayoría de los estudios disponibles que analizan la estabilidad de vectores basados en el genoma de los CoVs se han llevado a cabo con proteínas marcadoras, como la GFP o la luciferasa, y el análisis de la estabilidad se basa en la detección de la proteína o de su actividad, que pueden estar presentes cuando sólo una parte de la población viral mantiene el gen heterólogo. De hecho, en un reciente estudio realizado con vectores basados en el genoma del IBV se detectaba eficientemente actividad

luciferasa hasta el pase 12, mientras que la inestabilidad a nivel genético aparecía a partir del pase 5 (Bentley y col., 2013).

En general, la estabilidad genética de los vectores derivados de los CoVs depende de la naturaleza del gen heterólogo, de forma que algunos genes se expresan establemente durante más de 20 pases en cultivos celulares mientras que otros se pierden en el pase 2 (Sola y col., 2003; de Haan y col., 2005; Enjuanes y col., 2007; Shen y col., 2009). Así, características del gen heterólogo como el tamaño del inserto o la presencia en su secuencia de regiones con homología con el genoma viral, que favorezcan la recombinación homóloga, influyen en la tasa de recombinación y, por lo tanto, condicionan la estabilidad (Wang y col., 2003). Además, existen otras características del RNA o de la proteína heteróloga que pueden hacer que éstos tengan un efecto negativo (tóxico) para la célula o el ciclo viral, seleccionando negativamente el vector que contiene el inserto heterólogo. Estas características son difíciles de conocer *a priori*, de forma que para saber si un vector que exprese un gen concreto será estable es necesario generar el vector, lo cual supone un proceso laborioso.

Los genes de las proteínas GP5 y M del PRRSV tienen tamaños similares (606 y 522 nucleótidos, respectivamente) y las topologías propuestas para estas proteínas también son equivalentes, con cortos ectodominos expuestos entre tres segmentos transmembrana. Sin embargo, como se muestra en esta tesis, los vectores que expresan la proteína M fueron completamente estables, mientras que la proteína GP5 resultó tóxica y su expresión se perdió después de 4 ó 5 pases del virus en cultivos celulares. La inestabilidad de la proteína GP5 podría estar causada por la presencia en la secuencia codificante de regiones homólogas con secuencias del genoma del TGEV, lo que favorecería la recombinación y la pérdida del gen heterólogo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la identidad de secuencia del genoma del TGEV con el gen de la proteína GP5 y el de la proteína M. Además, el análisis de las secuencias del gen que codifica la proteína GP5 eliminadas en los vectores derivados del rTGEV después de los pases en cultivos mostró una elevada diversidad, que variaba desde la eliminación de la secuencia heteróloga completa a pequeñas deleciones que afectaban a la TRS. Esto indicó que los procesos de recombinación que llevan a la eliminación del inserto heterólogo no ocurrían en regiones con alta frecuencia de recombinación mediada por homología, sino en secuencias aleatorias, y daban lugar a la pérdida de la expresión del sgRNA heterólogo.

Además, el gen de la GP5, cuando se expresaba de forma aislada por vectores basados en el genoma del rTGEV se perdía en los primeros pases en cultivos celulares, mientras que la expresión de la proteína GP5 se detectaba hasta el pase 8 cuando se co-expresaba con la proteína M (Cruz y col., 2010). Este aumento de la estabilidad se atribuyó a la formación del heterodímero GP5-M, como se demostró mediante inmunofluorescencia y *Western blot* (Cruz y col., 2010; Thuenemann y col., 2013). Todos estos datos sugerían que la inestabilidad se debía a la toxicidad de la proteína GP5 que afectaba negativamente a la viabilidad celular o al ciclo del virus, de forma que los clones virales que perdían la expresión de la proteína heteróloga tenían una ventaja selectiva sobre los clones que contenían el gen heterólogo.

Otro factor determinante para la estabilidad de los vectores derivados de CoVs es la posición del genoma en la que se clonan los genes heterólogos (Bentley y col., 2013). Nuestro laboratorio demostró que los vectores de rTGEV que expresan la GFP son estables cuando el gen heterólogo se clona reemplazando los genes no esenciales 3a y 3b del TGEV, mientras que el gen de la GFP se perdía en el pase 2 cuando se insertaba entre los genes N y 7 del genoma (Sola y col., 2003). Resultados similares se han obtenido con vectores del MHV que expresan la luciferasa de luciérnaga, que son más estables cuando ésta se expresa reemplazando el gen HE (localizado entre el gen de la replicasa y el gen S), que cuando se expresa a partir de una nueva TRS entre los genes E y M (de Haan y col., 2005). Cabe destacar que, por la estrategia de expresión génica de los CoVs, la posición en el genoma y los niveles de expresión pueden estar muy relacionados. De modo que no se puede descartar que los niveles de expresión del gen heterólogo también influyan en la estabilidad de los vectores anteriormente descritos. De hecho, en el caso de los vectores derivados del MHV se determinó que los niveles de expresión de proteínas heterólogas son de 5 a 10 veces superiores cuando se expresan a partir de una nueva TRS entre los genes E y M que cuando lo hacen reemplazando el gen HE (de Haan y col., 2003). Durante el desarrollo de esta tesis se analizó por primera vez en CoVs el efecto de los niveles de expresión de un gen heterólogo en la estabilidad del vector, independientemente del lugar de inserción el genoma. Para ello, se partió de un vector 100% estable, que expresaba la proteína M del PRRSV y, sin modificar el *locus* desde el que se transcribía, se modificaron sus niveles de expresión. Así se demostró que la estabilidad de los vectores derivados del rTGEV que expresan la proteína M del PRRSV disminuyó al aumentar los niveles de

expresión. Nuestros datos están de acuerdo con resultados obtenidos con vectores derivados del IBV que codifican el gen de la GFP en los que se modificó su secuencia optimizando el uso de codones del IBV. Los vectores con un uso de codones optimizado, en los que la cantidad de proteína expresada fue 20 veces inferior a la obtenida a partir de vectores en los que no se optimizó el uso de codones, resultaron más estables (Bentley y col., 2013). Por lo tanto, el nivel de expresión del gen heterólogo también es un factor esencial en la estabilidad de los vectores derivados de CoV.

Durante el desarrollo de esta tesis se ha mostrado que la estabilidad de los vectores aumentó al disminuir el tamaño del inserto heterólogo, de forma que los vectores que codifican pequeños fragmentos de proteínas resultaron sistemáticamente más estables. Se ha mostrado que los vectores basados en el genoma del rTGEV que expresaban dominios de pequeño tamaño de las proteínas GP3 (altamente tóxica expresada a partir del TGEV) y GP4 del PRRSV, en construcciones de 58 y 63 aminoácidos respectivamente, fueron totalmente estables. La misma estrategia de expresión de pequeños dominios con relevancia inmunológica se aplicó a la proteína E2 del CSFV, un virus muy importante en salud animal, y más distante filogenéticamente a los CoVs. Estos rTGEVs también fueron totalmente estables después de 16 pases en cultivos celulares. En resumen, todos los rTGEVs generados en el laboratorio que expresaban pequeños dominios proteicos resultaron estables. Estos datos están de acuerdo con datos previos en los que vectores basados en el genoma del MHV que expresaban la luciferasa de luciérnaga eran más estables que los que expresaban la luciferasa de *Renilla*, de mayor tamaño que la anterior (de Haan y col., 2005). Por tanto, en el caso de los vectores derivados del TGEV, y probablemente para los CoVs en general, el tamaño del inserto heterólogo es un factor determinante para la estabilidad, de modo que la reducción del tamaño del inserto heterólogo es una estrategia útil para aumentar la estabilidad de los vectores derivados de CoVs. Este efecto del tamaño del inserto en la estabilidad podría relacionarse con una disminución de la probabilidad de recombinación no homóloga en secuencias cortas, o con la eliminación de dominios tóxicos presentes en las proteínas.

Durante el trabajo de esta tesis se exploró otra estrategia para la expresión estable de pequeños dominios antigénicos en vectores rTGEV, mediante el uso de la proteína M del PRRSV como matriz para la exposición de antígenos de interés. La expresión de dominios antigénicos fusionados o insertados en la proteína M del PRRSV, en la que se predice una

señal de retención en retículo endoplasmático, puede modificar el tráfico y acumulación en la célula infectada del dominio expresado. De hecho, la detección mediante inmunofluorescencia de los dominios antigénicos pequeños no se consiguió en ningún caso, mientras que su expresión asociada a la proteína transmembrana M se detectó eficientemente. La modificación del tráfico intracelular de los antígenos expresados podría suponer una ventaja adicional, dado que se ha observado que la expresión de péptidos fusionados a secuencias de retención en el retículo endoplasmático estimula la presentación antigénica, promoviendo la inducción de mayores respuestas citotóxicas (Wang y col., 2004; Loera-Arias y col., 2010).

A pesar de todos los progresos realizados durante esta tesis para mejorar la estabilidad de los vectores derivados de CoVs, cabe destacar que la estrategia de expresar pequeños dominios, eficaz para la generación de vectores estables, presenta la limitación de que algunos de estos pequeños dominios pueden tener una inmunogenicidad limitada. Por lo tanto, la generación de vectores basados en el genoma de CoVs que permitan el mantenimiento a largo plazo de insertos heterólogos de gran tamaño continúa siendo un reto. La identificación de los mecanismos responsables de la alta tasa de recombinación de CoVs es esencial para conseguir la estabilidad de los vectores, independientemente del tamaño o naturaleza del inserto heterólogo.

2. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL PRRSV

El uso de las proteínas del PRRSV como modelo en los estudios de estabilidad de los vectores derivados del TGEV, llevó a la generación de una colección de vectores estables en cultivos celulares. La protección frente al PRRSV conferida por este conjunto de vectores fue analizada *in vivo*. Después del desafío con una cepa virulenta, la inmunización previa con los vectores derivados del rTGEV produjo una reducción de los síntomas clínicos y del daño pulmonar, así como una eliminación más rápida del virus, en comparación con los animales control. Además, los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-8 en suero fueron menores en los animales inmunizados, coincidiendo con el menor daño pulmonar. Estos datos estaban de acuerdo con la observación de que durante infecciones experimentales con el PRRSV, la severidad y duración de las lesiones correlaciona con los niveles de IL-8 (Petry y col., 2007). En conjunto, los resultados obtenidos en el experimento *in vivo* con vectores derivados del rTGEV que expresaban antígenos del PRRSV con alta estabilidad,

representaron una mejora con respecto a experimentos previos de vacunación empleando vectores basados en el genoma del rTGEV que expresaban antígenos del PRRSV (Cruz y col., 2010), aunque todavía requieren mejoras adicionales.

El desconocimiento de los factores responsables de la protección frente al PRRSV supone un problema en el desarrollo de vacunas frente a este virus. Por una parte, la presencia de anticuerpos neutralizantes parece importante para prevenir la infección (Lopez y Osorio, 2004), pero no es suficiente para proporcionar protección (Murtaugh y Genzow, 2011) y el desarrollo de una respuesta citotóxica adecuada también se requiere para la eliminación del virus (Mateu y Diaz, 2008).

En el estudio realizado durante esta tesis, los animales inmunizados con una mezcla de vectores basados en el genoma del rTGEV que expresan establemente una colección de antígenos del PRRSV, desarrollaron anticuerpos específicos frente a la proteína GP5 de una forma más rápida, y en mayor nivel que los animales no inmunizados. Sin embargo, y a pesar de que uno de los epítomos de la proteína GP5 se considera el mayor responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes (Kim y Yoon, 2008), la respuesta neutralizante fue mayor en los animales no inmunizados. Este resultado podría explicarse por el hecho de que los animales inmunizados estuviesen parcialmente protegidos, infectándose por el PRRSV de modo menos eficiente que los animales no inmunizados. Esta hipótesis se refuerza por la coincidencia de los tiempos en los que se observaron diferencias en la capacidad neutralizante de los sueros con los aquéllos de menor viremia en los animales inmunizados. Sin embargo, con los datos disponibles no se puede determinar si la protección observada se debe a una respuesta mediada por células T, o a la inducción por la inmunización de bajos niveles de anticuerpos neutralizantes antes del desafío. Se ha descrito que la sensibilidad de los ensayos de neutralización es muy inferior a la obtenida mediante ELISA (Collins y col., 2012). De hecho, algunas vacunas comerciales no producen niveles detectables de anticuerpos neutralizantes antes del desafío con el virus virulento, pese a lo cual inducen un cierto nivel de protección (Geldhof y col., 2012).

El hecho de que la respuesta de anticuerpos totales frente a la proteína GP5, observada en los animales inmunizados fuese más rápida y de nivel más alto que en los animales no inmunizados, sugirió que el fragmento GP5fr, a pesar de su pequeño tamaño (34 aminoácidos), era inmunogénico. Por el contrario, los fragmentos GP3fr y GP4fr, que contenían epítomos lineales reconocidos por anticuerpos neutralizantes (Costers y col.,

2010; Vanhee y col., 2011) no indujeron una mayor respuesta, indicando que la inmunogenicidad de estos dominios era escasa. Estos resultados están de acuerdo con que ninguno de estos epítomos es inmunodominante en el contexto de la infección por el PRRSV. Además, a pesar de que en los tres casos se identificaron como epítomos lineales reconocidos por anticuerpos neutralizantes, se ha sugerido que la antigenicidad de estos dominios se basa en la estructura de la proteína (Vanhee y col., 2011). La inmunogenicidad del fragmento GP5fr podría deberse a la formación del heterodímero con la proteína M con la que se co-expresaba, indicando, por tanto que, a pesar de su pequeño tamaño el fragmento GP5fr formaba heterodímeros con la proteína M.

3. REQUERIMIENTO DE DIFERENTES DOMINIOS DE LA PROTEÍNA NSP14 PARA LA VIABILIDAD DEL TGEV

La mutagénesis de distintos aminoácidos de la proteína nsp14 del TGEV, diseñada para afectar a distintos dominios, descritos o potenciales, indicó la relevancia de esta proteína en el ciclo viral. Los experimentos con replicones mutantes y el análisis mediante RT-qPCR específicas para el gRNA viral o el sgmRNA-7 permitieron discriminar el impacto de las mutaciones sobre los procesos de replicación o transcripción. La mayoría de las mutaciones diseñadas produjeron una gran reducción en los niveles de transcripción sin afectar significativamente a la replicación. Este efecto es compatible con un hipotético papel de la proteína nsp14 en el proceso de cambio de molde requerido para la síntesis discontinua de sgmRNAs. Se ha propuesto que la actividad 3'-5' ExoN podría actuar procesando los extremos 3' de la cadena de polaridad negativa naciente asegurando la complementariedad con el nuevo molde (Minskaia y col., 2006; Denison y col., 2011). Sin embargo, los mutantes en el centro activo de la ExoN, que carecían de actividad exonucleasa (Minskaia y col., 2006; Bouvet y col., 2012), no presentaron una drástica reducción en la acumulación del sgmRNA-7. Es más, el análisis detallado de la síntesis de RNA en células transfectadas con los cDNAs infectivos indicó una reducción generalizada en la síntesis de RNA, respecto al cDNA WT, con una mayor disminución en la acumulación de gRNA que en la del sgmRNA-7, y reducciones similares para las cadenas de polaridad positiva y negativa. Por tanto, nuestros datos sugieren que la actividad ExoN no tendría un papel fundamental en el cambio de molde durante la transcripción.

La reducción en la síntesis de RNA observada en los mutantes del TGEV en el centro activo de la actividad ExoN de la proteína nsp14 fue similar a la descrita para los mutantes equivalentes de los virus HCoV-229E, MHV y SARS-CoV (Minskaia y col., 2006; Eckerle y col., 2007). Sin embargo, los mutantes de los virus HCoV-229E y TGEV no se rescataron, mientras que los mutantes de los virus MHV y SARS-CoV fueron viables y las mutaciones se mantuvieron en cultivos celulares durante 250 pases a pesar de que los virus exhiben un fenotipo mutador (Abbas, 1988; Minskaia y col., 2006; Eckerle y col., 2007; Eckerle y col., 2010). Estos resultados parecían sugerir la existencia de un requerimiento diferente de la actividad ExoN entre los géneros *Alfacoronavirus* y *Betacoronavirus*.

La mutación introducida en el motivo de unión a SAM de la proteína nsp14, que en ensayos bioquímicos elimina la actividad N7-MTasa (Chen y col., 2009; Bouvet y col., 2010; Chen y col., 2013), no afectó a la síntesis de RNA viral, como se mostró en los estudios con replicones del TGEV. Sin embargo, su importancia en el ciclo viral fue evidente por el bajo título obtenido para el virus mutante, el lento crecimiento y la rápida aparición de revertientes. El sistema de síntesis del 5'cap mejor caracterizado en el contexto de las infecciones virales es el de flavivirus, en los que una misma proteína, la NS5, lleva a cabo de forma secuencial las dos reacciones de metilación necesarias para la síntesis del 5'cap. Mutaciones que eliminan ambas actividades son letales para el virus, mientras que mutaciones que eliminan selectivamente la actividad 2'O-MTasa son viables, indicando que la actividad N7-MTasa es esencial para los flavivirus (Zhou y col., 2007; Kroschewski y col., 2008). Además, mutantes que presentan reducciones de más de un 75% de la actividad N7-MTasa son viables y su crecimiento es similar al del virus parental (Kroschewski y col., 2008). De modo similar, en CoVs, la actividad 2'O-MTasa no es esencial, y los virus mutantes son viables aunque inducen una respuesta inmune innata mayor que el virus parental (Zust y col., 2011). Sin embargo la actividad N7-MTasa sólo se había estudiado *in vitro* (Chen y col., 2009; Bouvet y col., 2010; Chen y col., 2013). Los datos mostrados en esta tesis indican, por primera vez en el campo de los CoVs, que la actividad N7-MTasa no es necesaria para la síntesis de RNA viral, pero que probablemente es esencial para la obtención de virus viables. Cabe destacar que en el método de genética reversa empleado en esta tesis, el cDNA transfectado se expresa a partir del promotor del CMV en el núcleo de la célula hospedadora, y el gRNA viral se transloca al citoplasma, donde se traduce el gen de la replicasa permitiendo la formación del RTC que, si es funcional, amplificará el RNA

viral en el citoplasma dando lugar a nuevas copias de gRNA y sgRNAs. Por tanto, en el caso de los cDNAs infectivos mutantes en el centro activo de la actividad N7-MTasa, también el gRNA producido a partir del promotor del CMV, con un 5'cap añadido por la maquinaria celular, daría lugar a la traducción de las proteínas de la replicasa viral, y a la replicación y transcripción de los RNAs virales. Sin embargo, la falta de 5'cap en los RNAs virales afectaría a su estabilidad y traducción eficiente, impidiendo que el ciclo viral se completase. Posiblemente, la formación de partículas virales y placas de lisis en el virus mutante en la actividad N7-MTasa se debió a la rápida aparición de revertientes. Las proteínas nsp14 revertientes, aunque en baja proporción, actuarían en *trans* permitiendo la síntesis de 5'cap de los sgRNAs virales, y con ello permitirían la síntesis de proteínas virales y la generación de partículas infectivas.

Además de las mutaciones descritas, que eliminan cada una de las actividades enzimáticas de la proteína nsp14, se introdujeron mutaciones en el motivo ZF1. La cristalización recientemente de la proteína nsp14 del SARS-CoV permitió identificar tres motivos ZFs en la estructura de la proteína (Ma y col., 2015). Estos dominios suelen aparecer en tándem en la estructura de las proteínas, y su función habitual es mediar la interacción con DNA, RNA, proteínas y moléculas pequeñas (Krishna y col., 2003). Se han descrito más de 40 tipos de motivos ZFs anotados en UniProtKB (http://www.uniprot.org/help/zn_fing; 15 de octubre de 2015) formando parte de la estructura de proteínas implicadas en una gran variedad de funciones, incluyendo funciones celulares esenciales como replicación, señalización, o apoptosis (Laity y col., 2001). Existen numerosos estudios acerca de las propiedades de unión de los motivos ZFs con el DNA, habiéndose caracterizado ampliamente en términos de afinidad y especificidad (Iuchi y Kuldell, 2005). Sin embargo, las interacciones de estos dominios con el RNA no están tan bien estudiadas (Iuchi y Kuldell, 2005). Únicamente se ha descrito que la modificación de la secuencia del ZF pueden alterar sus propiedades de unión al sustrato de RNA (Friesen y Darby, 1998).

En la proteína nsp14 de CoVs, los motivos ZFs podrían mediar la unión al RNA o a otras proteínas del RTC. Por lo tanto, mutaciones en estos dominios podrían afectar a la formación del RTC, o a la unión al RNA, requerida para las actividades ExoN y N7-MTasa de la proteína nsp14. La relevancia del motivo ZF1 en la actividad de la proteína nsp14 se había sugerido en estudios bioquímicos, en los que se observó que mutaciones en este

motivo modificaban las propiedades físico-químicas de la proteína (Ma y col., 2015). Además, sustituciones por alanina de los aminoácidos responsables de la coordinación del ión Zn^{2+} en el dominio ZF1 de la proteína nsp14 del MHV impiden el rescate del virus (Eckerle y col., 2006). Las mutaciones introducidas en el motivo ZF1 de la proteína nsp14 del TGEV se diseñaron para cambiar el tipo de motivo ZF, pero teóricamente manteniendo la posibilidad de unión del ión Zn^{2+} . La mutación ZF-H produjo, una ligera reducción en los niveles de replicación y una eliminación total de la transcripción, al igual que otros mutantes de la proteína nsp14 descritos en esta tesis. De acuerdo con estos resultados, el virus mutante rTGEV-ZF-H no fue viable. En cambio, el virus mutante rTGEV-ZF-C era competente en replicación y transcripción, y fue viable. El motivo ZF1 forma parte del dominio ExoN de la proteína nsp14, pero no del centro activo de la proteína (Ma y col., 2015). Además, el fenotipo observado en los mutantes en este motivo, tanto en el MHV (Eckerle y col., 2006) como en el TGEV difiere totalmente al observado al introducir mutaciones que eliminaban la actividad ExoN. Por otra parte, resultados preliminares de la secuenciación de regiones del genoma de los virus rTGEV-ZF-C y rTGEV-WT a lo largo de los pases en cultivos celulares, no mostraron diferencias en la tasa de error (datos no mostrados). Por lo tanto, no es probable que el dominio ZF1 esté implicado directamente en la actividad catalítica ExoN. La estructura cristalográfica de la proteína nsp14 indica que el motivo ZF1 no forma parte de la superficie de contacto de la proteína nsp14 con la proteína nsp10 (Ma y col., 2015). Sin embargo, podría estar implicado en las interacciones con otras proteínas del RTC, o en la unión al sustrato de RNA. Las bases moleculares del reconocimiento del dsRNA por los ZF son complejas, pues la interacción depende del contacto con los grupos fosfato e interacciones hidrofóbicas, por lo que es difícil predecir el impacto de las mutaciones en el motivo ZF1 sobre la unión a dsRNA (Brown, 2005). La caracterización a nivel bioquímico de estos mutantes permitiría definir si las mutaciones introducidas tienen impacto en la formación del RTC o en la afinidad o especificidad de unión al RNA.

4. PAPEL DE LA PROTEÍNA NSP14 EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

El mutante rTGEV-ZF-C fue viable y alcanzó un título similar al virus silvestre. La evaluación de la síntesis de RNA, tanto a nivel de replicón como a nivel de virus infectivo,

indicó que esta mutación no tenía un impacto significativo en replicación ni en transcripción. En línea con estos datos, las cinéticas de acumulación de gRNA viral en células infectadas con el rTGEV-ZF-C o el rTGEV-WT fueron indistinguibles a tiempos tempranos, correspondientes a la síntesis activa de RNA viral durante el ciclo infectivo del TGEV. La menor acumulación de gRNA viral a tiempos tardíos en la infección por el virus mutante se podría deber a una propagación menos eficiente que la del virus parental. Esta menor propagación era compatible con la menor inducción de apoptosis por el rTGEV-ZF-C, dado que la inducción de apoptosis en las etapas finales del ciclo viral es una estrategia para aumentar la diseminación viral (Mi y col., 2001; Bideshi y col., 2005; Amara y Mercer, 2015).

La respuesta antiviral inducida en la infección con el mutante fue muy inferior a la producida por el virus parental. La disminución de la respuesta inmune innata podría estar causada por la menor acumulación de dsRNA que se observó a tiempos tardíos después de la infección. Este hecho es compatible con dos posibles mecanismos: (1) el mutante rTGEV-ZF-C degrada dsRNA más eficientemente que el rTGEV-WT, ó (2) el rTGEV-ZF-C genera niveles inferiores de dsRNA durante la infección. Teniendo en cuenta que los niveles de dsRNA detectados a tiempos tempranos después de la infección eran similares para ambos virus, y que la actividad de la proteína nsp14 es la de una RNasa, el primer mecanismo parece más probable. Además, el hecho de que la co-infección con los virus parental y mutante produjese una reducción de la respuesta antiviral, en comparación con la desencadenada por la infección con el virus parental solo, indicó que la diferencia observada probablemente se debió a un aumento de la eficacia de la proteína nsp14-ZF-C en la degradación de los dsRNAs que actúan como PAMPs. Con estos datos, hemos propuesto un modelo de trabajo en el que la proteína nsp14 tendría una función previamente desconocida en la modulación de la respuesta antiviral, mediante la eliminación de los intermediarios de dsRNA que la inducen (Fig. 44). El mutante rTGEV-ZF-C eliminaría más eficientemente estas moléculas dando lugar a una respuesta inmune innata reducida.

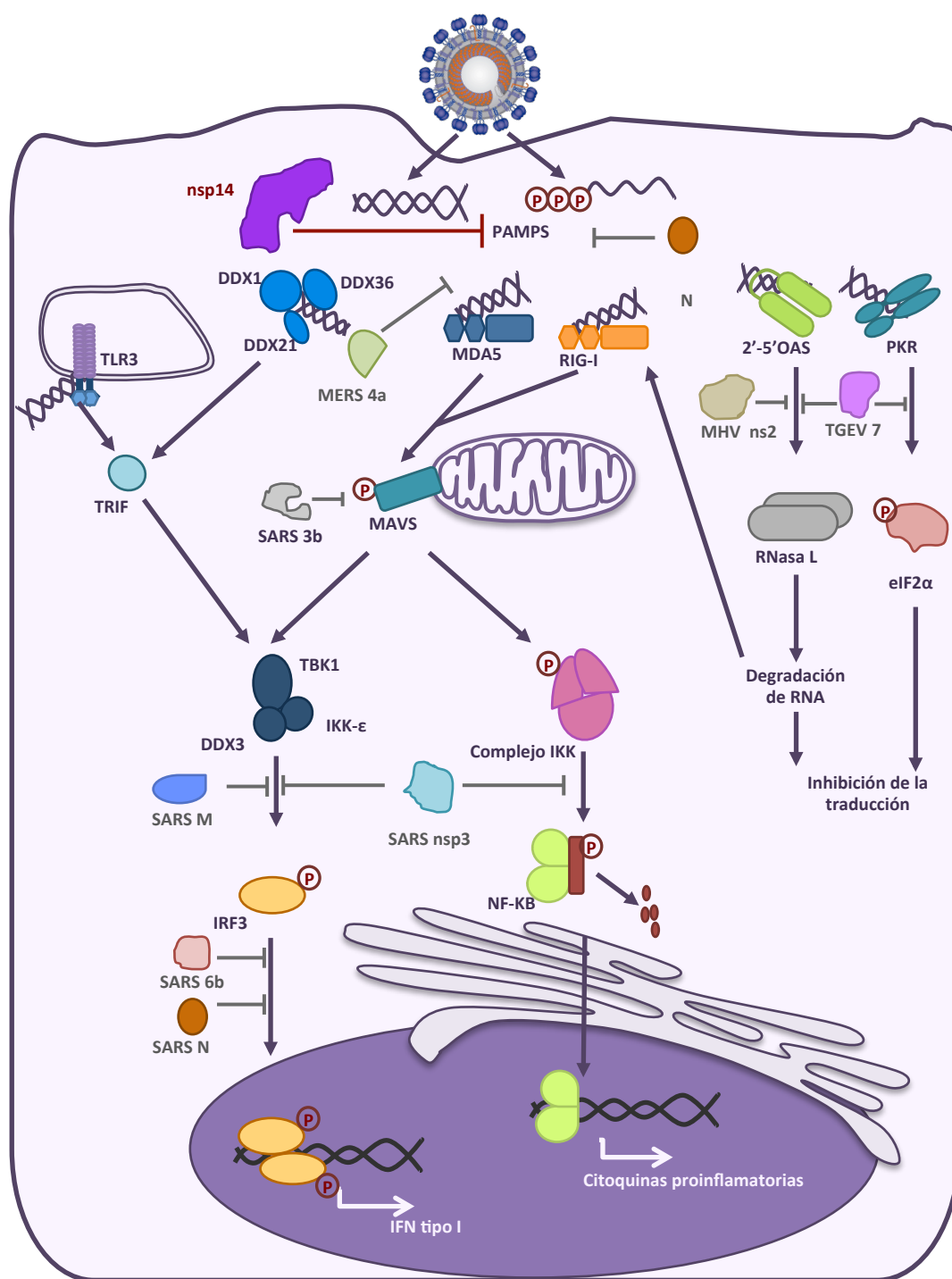


Figura 45. Modelo del papel de la proteína nsp14 y otras proteínas de CoVs en la inhibición de la respuesta antiviral. Esquema del reconocimiento de dsRNA por los sensores celulares y la inducción de la respuesta inmune innata. Se muestran distintas proteínas de CoV que contrarrestan esta respuesta, incluyendo la proteína nsp14 (en rojo).

La posible implicación de las RNasas ExoN y NendoU de CoVs en la evasión de la respuesta inmune innata se había postulado previamente (Kindler y Thiel, 2014), pero nuestros datos representan la primera evidencia experimental de un papel de la

exonucleasa de CoV en la modulación de la respuesta inmune innata del huésped. Estudios de sobreexpresión de la proteína nsp14 indicaron que esta proteína es antagonista del IFN, aunque no se había determinado si esta función se debe a su actividad ExoN o N7-MTasa (Shi y col., 2014). También la proteína nsp15, en ensayos de sobreexpresión, actúa como antagonista de IFN (Frieman y col., 2009). Además de los CoVs, los únicos virus de RNA que codifican una enzima con actividad ExoN son los arenavirus. Al igual que la proteína nsp14 de CoV, la nucleoproteína (NP) de *Arenavirus* tiene capacidad de unión a 5'cap, y actividad exonucleasa 3'-5' y se ha demostrado su actividad en la degradación de moléculas RNA de pequeño tamaño y en la inhibición de la producción de IFN durante la infección. Mutantes de la proteína NP que carecen de la actividad 3'-5'exonucleasa no inhiben la respuesta antiviral, y están atenuados *in vivo* (Qi y col., 2010; Hastie y col., 2011; Jiang y col., 2013). Además, la proteína NP interacciona directamente con los RLRs RIG-I y MDA-5, lo que apoya el mecanismo propuesto de degradación de los dsRNAs que activan la respuesta antiviral (Zhou y col., 2010). En el caso de los CoVs, que inhiben eficientemente la inducción de IFN durante la infección, la proteína nsp14 actuaría también en la degradación de los PAMPs de dsRNA. No existe evidencia de la interacción de la nsp14 de CoVs con los RLRs, pero se ha descrito su interacción con la helicasa celular DDX-1 (Xu y col., 2010) que recientemente se ha identificado como sensor citoplasmático que reconoce dsRNA y dispara la respuesta de IFN (Zhang y col., 2011).

De acuerdo con el modelo propuesto (Fig. 44), los mutantes de CoV que carecen de actividad ExoN provocarían una inducción exacerbada de la respuesta inmune innata. En el caso del SARS-CoV, los mutantes sin actividad ExoN están atenuados en el modelo animal de ratón, y la eliminación de estos mutantes es más rápida que la del virus silvestre (Graham y col., 2012). Este fenotipo es compatible con una mayor inducción de la respuesta inmune innata, aunque esta posibilidad no se evaluó. Una respuesta inmune exacerbada podría ser un factor adicional que impida el rescate de los virus que carecen de actividad ExoN, como ocurrió en el caso de los virus HCoV-229E o TGEV con mutaciones en el centro activo del dominio ExoN de la proteína nsp14, junto con la reducción en la síntesis de RNA y el incremento en la acumulación de mutaciones. De hecho, en el caso de SARS-CoV el rescate de los virus se realiza en células Vero, deficientes en la inducción de IFN (Chew y col., 2009). Asimismo, el rescate de los MHV mutantes sin actividad ExoN no se conseguía utilizando la línea celular DBT (Eckerle y col., 2006). Sin embargo, el rescate y

caracterización de estos mutantes se realizó eficientemente utilizando un subclon de las anteriores (células DBT-9) (Eckerle y col., 2007), cuya respuesta antiviral no se ha caracterizado, pero en el que la replicación de MHV es muy eficiente, alcanzándose altos títulos (Chen y Baric, 1996). De hecho, de acuerdo con estos datos y apoyando nuestro modelo, estudios preliminares indicaron que la transfección de los cDNAs mutantes del TGEV en células Vero permite la detección de RNA viral de los rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoIII en pase 1, pero finalmente el virus se perdía, como ocurría con el rTGEV-WT (datos no mostrados). La utilización de líneas celulares deficientes en IFN, pero permisivas a la infección por el TGEV, permitiría analizar si la inducción de una respuesta inmune innata exacerbada era la causante de la no viabilidad de los mutantes rTGEV-ExoI y rTGEV-ExoII. Este nuevo mecanismo de modulación de la respuesta inmune innata por la proteína nsp14, puede tener implicaciones para utilizar esta proteína como diana en la atenuación de vectores virales.

En resumen, el trabajo realizado durante esta tesis ha permitido mejorar la estabilidad de los vectores basado en genomas de CoVs, bien reduciendo el tamaño del inserto heterólogo, bien utilizando una proteína que se expresa establemente como matriz para la exposición de dominios antigénicos. Además, se ha descrito un nuevo mecanismo de modulación de la respuesta inmune innata por CoV, que implica la actividad ExoN de la proteína nsp14. Estos resultados abren nuevas vías de investigación con implicaciones en el desarrollo de vectores derivados de CoVs que sean más eficaces, así como en los mecanismos involucrados en la atenuación de CoVs.

CONCLUSIONES

1. Los vectores basados en el genoma del TGEV que expresan pequeños fragmentos de proteínas resultaron estables sistemáticamente. Por tanto, la reducción en el tamaño del inserto heterólogo es una estrategia útil para la obtención de vectores estables basados en el genoma del TGEV.
2. Los vectores basados en el genoma del TGEV que expresan la proteína M del PRRSV fueron completamente estables. La utilización de esta proteína como matriz para exponer pequeños dominios antigénicos es una estrategia alternativa para la expresión estable de estos dominios antigénicos con vectores basados en el genoma del TGEV.
3. El aumento de los niveles de transcripción del gen que codifica la proteína M del PRRSV, expresada de forma estable con vectores derivados del rTGEV, mostró que la estabilidad de los vectores basados en el genoma de CoVs depende del nivel de expresión de la proteína heteróloga.
4. El uso de vectores basados en el genoma del TGEV, que expresan de forma estable una colección de antígenos del PRRSV para la inmunización de animales, resultó en una respuesta de anticuerpos totales frente a la proteína GP5 más rápida y con mayor título que en los animales control, y confirió protección parcial frente a los signos clínicos de la enfermedad.
5. La proteína nsp14 del TGEV se requiere para la transcripción viral, dado que la eliminación de dominios de esta proteína, o mutaciones puntuales en el dominio ZF1 de la misma, impidieron la transcripción de sgmRNAs virales.
6. La actividad 3'-5' ExoN de la proteína nsp14 es esencial para la viabilidad del TGEV. Sin embargo, esta actividad no es fundamental para la síntesis de RNAs y proteínas virales.
7. La actividad N7-MTasa de la proteína nsp14 no es esencial para la síntesis de RNA viral en el TGEV. Sin embargo, la introducción de una mutación que elimina esta actividad dio lugar a la rápida reversión de los virus mutantes, que recuperaban la actividad N7-

MTasa. Por lo tanto, la actividad N7-MTasa se requiere para completar el ciclo viral eficientemente.

- 8.** La mutación del motivo ZF1 de la proteína nsp14 del TGEV afectó a la acumulación de dsRNA en las etapas tardías del ciclo viral y retrasó la inducción de la respuesta inmune innata. La disminución de la respuesta antiviral en coinfecciones con los virus nativo y rTGEV-ZF-C, respecto a infecciones con solo el virus nativo nos ha permitido postular que la proteína nsp14 modula la respuesta antiviral.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbas, A.K.**, 1988. A reassessment of the mechanisms of antigen-specific T-cell- dependent B-cell activation. *Immunol. Today* **9**, 89-94.
- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J.**, 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**, 36-42.
- Adedeji, A.O., Marchand, B., Te Velthuis, A.J., Snijder, E.J., Weiss, S., Eoff, R.L., Singh, K., Sarafianos, S.G.**, 2012. Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One* **7**, e36521.
- Albina, E., Carrat, C., Charley, B.**, 1998. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 485-490.
- Alejska, M., Malinowska, N., Urbanowicz, A., Figlerowicz, M.**, 2005. Two types of non-homologous RNA recombination in brome mosaic virus. *Acta Biochim. Pol.* **52**, 833-844.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuñiga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L.**, 2006. Construction of a SARS-CoV infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **80**, 10900-10906.
- Almazan, F., DeDiego, M.L., Sola, I., Zuñiga, S., Nieto-Torres, J.L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L.**, 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *MBio* **4**, e00650-00613.
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L.**, 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688.
- Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5516-5521.
- Almazan, F., Marquez-Jurado, S., Nogales, A., Enjuanes, L.**, 2015. Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes. *Methods Mol. Biol.* **1282**, 135-152.
- Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., Marquez-Jurado, S., Morales, L., Becares, M., Enjuanes, L.**, 2014. Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. *Virus Res.* **189**, 262-270.

- Alonso, S., Izeta, A., Sola, I., Enjuanes, L., 2002a.** Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **76**, 1293-1308.
- Alonso, S., Sola, I., Teifke, J., Reimann, I., Izeta, A., Balach, M., Plana-Durán, J., Moormann, R.J.M., Enjuanes, L., 2002b.** In vitro and in vivo expression of foreign genes by transmissible gastroenteritis coronavirus-derived minigenomes. *J. Gen. Virol.* **83**, 567-579.
- Amara, A., Mercer, J., 2015.** Viral apoptotic mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 461-469.
- Anderson, R.P., Roth, J.R., 1977.** Tandem genetic duplications in phage and bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 473-505.
- Annan, A., Baldwin, H.J., Corman, V.M., Klose, S.M., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Badu, E.K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y.A., Kalko, E.K., Lina, P.H., Godlevska, E.V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F., 2013.** Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 456-459.
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K., 2006.** Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* **80**, 3994-4004.
- Arndt, A.L., Larson, B.J., Hogue, B.G., 2010.** A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J. Virol.* **84**, 11418-11428.
- Assiri, A., McGeer, A., Perl, T.M., Price, C.S., Al Rabeeah, A.A., Cummings, D.A., Alabdullatif, Z.N., Assad, M., Almulhim, A., Makhdoom, H., Madani, H., Alhakeem, R., Al-Tawfiq, J.A., Cotten, M., Watson, S.J., Kellam, P., Zumla, A.I., Memish, Z.A., 2013.** Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N. Engl. J. Med.* **369**, 407-416.

B

- Balint, A., Farsang, A., Zadori, Z., Hornyak, A., Dencso, L., Almazan, F., Enjuanes, L., Belak, S., 2012.** Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus Strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J. Virol.* **86**, 6258-6267.
- Bautista, E.M., Suarez, P., Molitor, T.W., 1999.** T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* **144**, 117-134.

- Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N., Whittaker, G.R., 2012.** Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* **4**, 1011-1033.
- Bentley, K., Armesto, M., Britton, P., 2013.** Infectious bronchitis virus as a vector for the expression of heterologous genes. *PLoS One* **8**, e67875.
- Bhardwaj, K., Guarino, L., Kao, C.C., 2004.** The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J. Virol.* **78**, 12218-12224.
- Bhardwaj, K., Sun, J., Holzenburg, A., Guarino, L.A., Kao, C.C., 2006.** RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J. Mol. Biol.* **361**, 243-256.
- Bideshi, D.K., Tan, Y., Bigot, Y., Federici, B.A., 2005.** A viral caspase contributes to modified apoptosis for virus transmission. *Genes Dev.* **19**, 1416-1421.
- Botner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S., 1997.** Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* **141**, 497-499.
- Bouvet, M., Debarnot, C., Imbert, I., Selisko, B., Snijder, E.J., Canard, B., Decroly, E., 2010.** In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog.* **6**, e1000863.
- Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B., Decroly, E., 2012.** RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 9372-9377.
- Bouvet, M., Lugari, A., Posthuma, C.C., Zevenhoven, J.C., Bernard, S., Betzi, S., Imbert, I., Canard, B., Guillemot, J.C., Lecine, P., Pfefferle, S., Drosten, C., Snijder, E.J., Decroly, E., Morelli, X., 2014.** Coronavirus nsp10, a critical co-factor for activation of multiple replicative enzymes. *J. Biol. Chem.* **289**, 25783-25796.
- Brian, D.A., Baric, R.S., 2005.** Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 1-30.
- Brierley, I., Digard, P., Inglis, S.C., 1989.** Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**, 537-547.
- Brockway, S.M., Denison, M.R., 2005.** Mutagenesis of the murine hepatitis virus nsp1-coding region identifies residues important for protein processing, viral RNA synthesis, and viral replication. *Virology* **340**, 209-223.
- Brown, R.S., 2005.** Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 94-98.

Bukreyev, A., Skiadopoulos, M.H., Murphy, B.R., Collins, P.L., 2006. Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors. *J. Virol.* **80**, 10293-10306.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611-622.

C

Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., Britton, P., 2003. Recombinant avian Infectious Bronchitis Virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.* **77**, 9084-9089.

Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D., Britton, P., 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **75**, 12359-12369.

Cavanagh, D., 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* **34**, 439-448.

Cavanagh, D., Casais, R., Armesto, M., Hodgson, T., Izadkhasti, S., Davies, M., Lin, F., Tarpey, I., Britton, P., 2007. Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. *Vaccine* **25**, 5558-5562.

Chand, R.J., Tribble, B.R., Rowland, R.R., 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 256-263.

Chang, C.K., Sue, S.C., Yu, T.H., Hsieh, C.M., Tsai, C.K., Chiang, Y.C., Lee, S.J., Hsiao, H.H., Wu, W.J., Chang, W.L., Lin, C.H., Huang, T.H., 2006. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J. Biomed. Sci.* **13**, 59-72.

Charerntantanakul, W., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World J. Virol.* **1**, 23-30.

Charerntantanakul, W., Platt, R., Roth, J.A., 2006. Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral Immunol.* **19**, 646-661.

Chattha, K.S., Roth, J.A., Saif, L.J., 2015. Strategies for design and application of enteric viral vaccines. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **3**, 375-395.

Chen, W., Baric, R.S., 1996. Molecular anatomy of mouse hepatitis virus persistence: coevolution of increased host cell resistance and virus virulence. *J. Virol.* **70**, 3947-3960.

- Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., Guo, D., 2009.** Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3484-3489.
- Chen, Y., Tao, J., Sun, Y., Wu, A., Su, C., Gao, G., Cai, H., Qiu, S., Wu, Y., Ahola, T., Guo, D., 2013.** Structure-function analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA cap guanine-N7-methyltransferase. *J. Virol.* **87**, 6296-6305.
- Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y., Jiang, W., Arnold, E., Sarafianos, S.G., Ding, J., 2005.** Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**, 165-176.
- Chew, T., Noyce, R., Collins, S.E., Hancock, M.H., Mossman, K.L., 2009.** Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol. Immunol.* **46**, 393-399.
- Chow, J., Franz, K.M., Kagan, J.C., 2015.** PRRs are watching you: Localization of innate sensing and signaling regulators. *Virology* **479-480**, 104-109.
- Coleman, C.M., Frieman, M.B., 2014.** Coronaviruses: important emerging human pathogens. *J. Virol.* **88**, 5209-5212.
- Coley, S.E., Lavi, E., Sawicki, S.G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005.** Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J. Virol.* **79**, 3097-3106.
- Collins, J., Dee, S., Halbur, P., Keffaber, K., Lautner, B., McCaw, M., Rodibaugh, M., Sanford, E., Yeske, P., 2012.** Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection *Swine Health and Production*, **4**, 33-35.
- Correa, I., Jimenez, G., Sune, C., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1988.** Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* **10**, 77-93.
- Corse, E., Machamer, C.E., 2003.** The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction. *Virology* **312**, 25-34.
- Costers, S., Lefebvre, D.J., Van Doorselaere, J., Vanhee, M., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010.** GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralizing epitope that is susceptible to immunoselection in vitro. *Arch. Virol.* **155**, 371-378.
- Cruz, J.L.G., Becares, M., Sola, I., Oliveros, J.C., Enjuanes, L., Zuñiga, S., 2013.** Alphacoronavirus protein 7 modulates host innate immune response. *J. Virol.* **87**, 9754-9767.
- Cruz, J.L.G., Sola, I., Becares, M., Alberca, B., Plana, J., Enjuanes, L., Zuñiga, S., 2011.** Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence. *PLoS Pathog.* **7**, e1002090.

Cruz, J.L.G., Zuñiga, S., Becares, M., Sola, I., Ceriani, J.E., Juanola, S., Plana, J., Enjuanes, L., 2010. Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Res.* **154**, 150-160.

Curtis, K.M., Yount, B., Baric, R.S., 2004. Reverse genetic analysis of gene function in transmissible gastroenteritis virus replication. *J. Virol.* **78**, 6061-6066.

D

Darwich, L., Diaz, I., Mateu, E., 2010. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res.* **154**, 123-132.

de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J., 2012. Coronaviridae, *en*: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 774-796.

de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R.S., Brown, C.S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R.A., Galiano, M., Gorbalenya, A.E., Memish, Z.A., Perlman, S., Poon, L.L., Snijder, E.J., Stephens, G.M., Woo, P.C., Zaki, A.M., Zambon, M., Ziebuhr, J., 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* **87**, 7790-7792.

de Haan, C.A., Haijema, B.J., Boss, D., Heuts, F.W., Rottier, P.J., 2005. Coronaviruses as vectors: stability of foreign gene expression. *J. Virol.* **79**, 12742-12751.

de Haan, C.A., Rottier, P.J., 2005. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **64**, 165-230.

de Haan, C.A., van Genne, L., Stoop, J.N., Volders, H., Rottier, P.J., 2003. Coronaviruses as vectors: position dependence of foreign gene expression. *J. Virol.* **77**, 11312-11323.

de Haan, C.A., Volders, H., Koetzner, C.A., Masters, P.S., Rottier, P.J., 2002. Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J. Virol.* **76**, 12491-12502.

de Lima, M., Pattnaik, A.K., Flores, E.F., Osorio, F.A., 2006. Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **353**, 410-421.

Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., Canard, B., 2012. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 51-65.

- Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Canard, B., 2008.** Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *J. Virol.* **82**, 8071-8084.
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Alvarez, E., Oliveros, J.C., Zhao, J., Fett, C., Perlman, S., Enjuanes, L., 2011.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog.* **7**, e1002315.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Norén, O., Laude, H., 1992.** Amino-peptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-420.
- Delmas, B., Gelfi, J., Laude, H., 1986.** Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **67**, 1405-1418.
- Delmas, B., Laude, H., 1990.** Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* **64**, 5367-5375.
- Delputte, P.L., Van Gorp, H., Favoreel, H.W., Hoebeke, I., Delrue, I., Dewerchin, H., Verdonck, F., Verhasselt, B., Cox, E., Nauwynck, H.J., 2011.** Porcine sialoadhesin (CD169/Siglec-1) is an endocytic receptor that allows targeted delivery of toxins and antigens to macrophages. *PLoS One* **6**, e16827.
- Denison, M.R., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Eckerle, L.D., Baric, R.S., 2011.** Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol.* **8**, 270-279.
- Devaraj, S.G., Wang, N., Chen, Z., Chen, Z., Tseng, M., Barretto, N., Lin, R., Peters, C.J., Tseng, C.T., Baker, S.C., Li, K., 2007.** Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.* **282**, 32208-32221.
- Dominguez, S.R., O'Shea, T.J., Oko, L.M., Holmes, K.V., 2007.** Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1295-1300.
- Donaldson, E.F., Yount, B., Sims, A.C., Burkett, S., Pickles, R.J., Baric, R.S., 2008.** Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J. Virol.* **82**, 11948-11957.
- Doyle, L.P., Hutchings, L.M., 1946.** A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **108**, 257-259.
- Drake, J.W., Holland, J.J., 1999.** Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13910-13913.

Draper, S.J., Heeney, J.L., 2010. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 62-73.

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W., 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967-1976.

Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* **56**, 9-19.

E

Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Denison, M.R., 2010. Infidelity of SARS-CoV nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* **6**, e1000896.

Eckerle, L.D., Brockway, S.M., Sperry, S.M., Lu, X., Denison, M.R., 2006. Effects of mutagenesis of murine hepatitis virus nsp1 and nsp14 on replication in culture. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 55-60.

Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L., Denison, M.R., 2007. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J. Virol.* **81**, 12135-12144.

Egloff, M.P., Ferron, F., Campanacci, V., Longhi, S., Rancurel, C., Dutartre, H., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Cambillau, C., Canard, B., 2004. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3792-3796.

Eleouet, J.F., Chilmonczyk, S., Besnardeau, L., Laude, H., 1998. Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J. Virol.* **72**, 4918-4924.

- Eleouet, J.F., Slee, E.A., Saurini, F., Castagné, N., Poncet, D., Garrido, C., Solary, E., Martin, S.J., 2000. The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J. Virol.* **74**, 3975-3983.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 211-230.
- Enjuanes, L., Correa, I., Jimenez, G., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., 1987. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **218**, 351-363.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2008. The Nidovirales, *en*: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430.
- Enjuanes, L., Sola, I., Almazan, F., Ortego, J., Izeta, A., Gonzalez, J.M., Alonso, S., Sanchez, J.M., Escors, D., Calvo, E., Riquelme, C., Sanchez, C., 2001. Coronavirus derived expression systems. *J. Biotechnol.* **88**, 183-204.
- Enjuanes, L., Sola, I., Alonso, S., Escors, D., Zuñiga, S., 2005. Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 161-197.
- Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S., Moreno, J.L., 2007a. Coronavirus RNA synthesis: Transcription, *en*: Thiel, V. (Ed.), *Coronaviruses: Molecular and cellular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 81-107.
- Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S., Ortego, J., 2007b. Expression vectors based on coronavirus genomes, *en*: Hefferon, K.L. (Ed.), *Virus expression vectors*. Tranworld Research Network, Kerala, pp. 147-182.
- Enjuanes, L., Van der Zeijst, B.A.M., 1995. Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus epidemiology, *en*: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, pp. 337-376.
- Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H., Enjuanes, L., 2001. Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J. Virol.* **75**, 12228-12240.

F

Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzynska-Kokorniak, A., Figlerowicz, M., 2003. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med. Res. Rev.* **23**, 488-518.

Firth, A.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Posthuma, C.C., 2011. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *J. Gen. Virol.* **92**, 1097-1106.

Freundt, E.C., Yu, L., Park, E., Lenardo, M.J., Xu, X.N., 2009. Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein. *J. Virol.* **83**, 6631-6640.

Frieman, M., Ratia, K., Johnston, R.E., Mesecar, A.D., Baric, R.S., 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* **83**, 6689-6705.

Friesen, W.J., Darby, M.K., 1998. Specific RNA binding proteins constructed from zinc fingers. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 543-546.

Frolov, I., Hoffman, T.A., Prágai, B.M., Dryga, S.A., Huang, H.V., Schlesinger, S., Rice, C.M., 1996. Alphavirus-based expression vectors: Strategies and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11371-11377.

G

Gadlage, M.J., Sparks, J.S., Beachboard, D.C., Cox, R.G., Doyle, J.D., Stobart, C.C., Denison, M.R., 2010. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J. Virol.* **84**, 280-290.

Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-374.

Garbino, J., Crespo, S., Aubert, J.D., Rochat, T., Ninet, B., Deffernez, C., Wunderli, W., Pache, J.C., Soccal, P.M., Kaiser, L., 2006. A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1009-1015.

Garcia, M.A., Meurs, E.F., Esteban, M., 2007. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**, 799-811.

Garcia-Arriaza, J., Arnaez, P., Gomez, C.E., Sorzano, C.O., Esteban, M., 2013. Improving Adaptive and Memory Immune Responses of an HIV/AIDS Vaccine Candidate MVA-B by

Deletion of Vaccinia Virus Genes (C6L and K7R) Blocking Interferon Signaling Pathways. *PLoS One* **8**, e66894.

Garcia-Arriaza, J., Gomez, C.E., Sorzano, C.O., Esteban, M., 2014. Deletion of the vaccinia virus N2L gene encoding an inhibitor of IRF3 improves the immunogenicity of modified vaccinia virus Ankara expressing HIV-1 antigens. *J. Virol.* **88**, 3392-3410.

Geldhof, M.F., Vanhee, M., Van Breedam, W., Van Doorselaere, J., Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2012. Comparison of the efficacy of autogenous inactivated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) vaccines with that of commercial vaccines against homologous and heterologous challenges. *BMC Vet. Res.* **8**, 182.

Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Gottsche, M., Panning, M., Felix Drexler, J., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Muller, M., Pfefferle, S., Drosten, C., 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626-631.

Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Almazan, F., Calvo, E., Enjuanes, L., 2002. Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J. Virol.* **76**, 4655-4661.

Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**, 17-37.

Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C., 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* **76**, 3697-3708.

Graham, R.L., Becker, M.M., Eckerle, L.D., Bolles, M., Denison, M.R., Baric, R.S., 2012. A live, impaired-fidelity coronavirus vaccine protects in an aged, immunocompromised mouse model of lethal disease. *Nat. Med.* **18**, 1820-1826.

Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 836-848.

Graham, R.L., Sims, A.C., Brockway, S.M., Baric, R.S., Denison, M.R., 2005. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* **79**, 13399-13411.

- Hagemeijer, M.C., Verheije, M.H., Ulasli, M., Shaltiel, I.A., de Vries, L.A., Reggiori, F., Rottier, P.J., de Haan, C.A.,** 2010. Dynamics of coronavirus replication-transcription complexes. *J. Virol.* **84**, 2134-2149.
- Haijema, B.J., Volders, H., Rottier, P.J.,** 2004. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J. Virol.* **78**, 3863-3871.
- Hassel, B.A., Zhou, A., Sotomayor, C., Maran, A., Silverman, R.H.,** 1993. A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J.* **12**, 3297-3304.
- Hastie, K.M., Kimberlin, C.R., Zandonatti, M.A., MacRae, I.J., Saphire, E.O.,** 2011. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 2396-2401.
- Herrewegh, A.A.P.M., Vennema, H., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., Groot, P.J.,** 1995. The molecular genetics of feline coronavirus comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology* **212**, 622-631.
- Holtkamp, D., Kliebenstein, J.B., Zimmerman, J.J., Neumann, E.J., Rotto, H., Yoder, T., Wang, C., Yeske, P., Mowrer, C., Haley, C.,** 2012. Economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on U.S. pork producers. *Animal Industry Report*: AS 658, ASL R2671
- Hovanessian, A.G.,** 2007. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'-oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 351-361.
- Huang, C., Narayanan, K., Ito, N., Peters, C.J., Makino, S.,** 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is released in membranous structures from 3a protein-expressing cells and infected cells. *J. Virol.* **80**, 210-217.
- Huang, C., Peters, C.J., Makino, S.,** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 6 is a virion-associated protein and is released from 6 protein-expressing cells. *J. Virol.* **81**, 5423-5426.
- Husser, L., Alves, M.P., Ruggli, N., Summerfield, A.,** 2011. Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. *Virus Res.* **159**, 9-16.

Iborra, F.J., Buckle, V., 2008. Wide confocal cytometry: a new approach to study proteomic and structural changes in the cell nucleus during the cell cycle. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 45-53.

Imbert, I., Guillemot, J.C., Bourhis, J.M., Bussetta, C., Coutard, B., Egloff, M.P., Ferron, F., Gorbalenya, A.E., Canard, B., 2006. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* **25**, 4933-4942.

Imbert, I., Snijder, E.J., Dimitrova, M., Guillemot, J.C., Lecine, P., Canard, B., 2008. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* **133**, 136-148.

Iuchi, S., Kuldell, N., 2005. Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function, 1st. ed. Landes Bioscience, and Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA.

Ivanov, K.A., Thiel, V., Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Snijder, E.J., Ziebuhr, J., 2004. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* **78**, 5619-5632.

Ivanov, K.A., Ziebuhr, J., 2004. Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J. Virol.* **78**, 7833-7838.

J

Jacobs, L., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M., 1986. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* **57**, 1010-1015.

Jensen, S., Thomsen, A.R., 2012. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J. Virol.* **86**, 2900-2910.

Jeong, H.J., Song, Y.J., Lee, S.W., Lee, J.B., Park, S.Y., Song, C.S., Ha, G.W., Oh, J.S., Oh, Y.K., Choi, I.S., 2010. Comparative measurement of cell-mediated immune responses of swine to the M and N proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 503-512.

Jiang, X., Huang, Q., Wang, W., Dong, H., Ly, H., Liang, Y., Dong, C., 2013. Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression. *J. Biol. Chem.* **288**, 16949-16959.

Jimenez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., Enjuanes, L., 1986. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* **60**, 131-139.

Jimenez-Guardeño, J.M., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Enjuanes, L., 2014. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004320.

Johnson, C.R., Griggs, T.F., Gnanandarajah, J., Murtaugh, M.P., 2011. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J. Gen. Virol.* **92**, 1107-1116.

Joseph, J.S., Saikatendu, K.S., Subramanian, V., Neuman, B.W., Brooun, A., Griffith, M., Moy, K., Yadav, M.K., Velasquez, J., Buchmeier, M.J., Stevens, R.C., Kuhn, P., 2006. Crystal structure of nonstructural protein 10 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus reveals a novel fold with two zinc-binding motifs. *J. Virol.* **80**, 7894-7901.

Jung, K., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet. J.* **204**, 134-143.

K

Kallberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., Xu, J., 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* **7**, 1511-1522.

Kappes, M.A., Faaberg, K.S., 2015. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology* **479-480**, 475-486.

Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M., Murtaugh, M.P., 1996. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J. Gen. Virol.* **77**, 1271-1276.

Karniychuk, U.U., Geldhof, M., Vanhee, M., Van Doorselaere, J., Saveleva, T.A., Nauwynck, H.J., 2010. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet. Res.* **6**, 30.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa,

- C., Matsuura, Y., Fujita, T., Akira, S.,** 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105.
- Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L.,** 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* **133**, 477-483.
- Kim, L., Hayes, J., Lewis, P., Parwani, A.V., Chang, K.O., Saif, L.J.,** 2000. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.* **145**, 1133-1147.
- Kim, W.I., Yoon, K.J.,** 2008. Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Genes* **37**, 380-391.
- Kimman, T.G., Cornelissen, L.A., Moormann, R.J., Rebel, J.M., Stockhofe-Zurwieden, N.,** 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* **27**, 3704-3718.
- Kindler, E., Thiel, V.,** 2014. To sense or not to sense viral RNA-essentials of coronavirus innate immune evasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**, 69-75.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J.,** 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226.
- Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A., Palese, P.,** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* **81**, 548-557.
- Krishna, S.S., Majumdar, I., Grishin, N.V.,** 2003. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* **31**, 532-550.
- Kroschewski, H., Lim, S.P., Butcher, R.E., Yap, T.L., Lescar, J., Wright, P.J., Vasudevan, S.G., Davidson, A.D.,** 2008. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 19410-19421.
- Kvisgaard, L.K., Hjulsager, C.K., Kristensen, C.S., Lauritsen, K.T., Larsen, L.E.,** 2013. Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years. *Virus Res.* **178**, 197-205.

L

- Lai, M.M.C.**, 1996. Recombination in large RNA viruses: coronaviruses. *Semin. Virol.* **7**, 381-388.
- Lai, M.M.C., Cavanagh, D.**, 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**, 1-100.
- Lai, M.M.C., Perlman, S., Anderson, L.**, 2007. Coronaviridae, *en*: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E.**, 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 39-46.
- Langan, T.J., Chou, R.C.**, 2011. Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol. Biol.* **761**, 75-83.
- Lauber, C., Goeman, J.J., Parquet Mdel, C., Nga, P.T., Snijder, E.J., Morita, K., Gorbalenya, A.E.**, 2013. The footprint of genome architecture in the largest genome expansion in RNA viruses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003500.
- Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P.T., Morita, K., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E.**, 2012. Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch. Virol.* **157**, 1623-1628.
- Laude, H., Masters, P.S.**, 1995. The coronavirus nucleocapsid protein, *en*: Siddell, S.G. (Ed.), The coronaviridae. Plenum press, New York, pp. 141-158.
- Le Potier, M.F., Blanquefort, P., Morvan, E., Albina, E.**, 1997. Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French 'Pays de la Loire' region. *Vet. Microbiol.* **55**, 355-360.
- Lehmann, K.C., Gulyaeva, A., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Janssen, G.M., Ruben, M., Overkleeft, H.S., van Veelen, P.A., Samborskiy, D.V., Kravchenko, A.A., Leontovich, A.M., Sidorov, I.A., Snijder, E.J., Posthuma, C.C., Gorbalenya, A.E.**, 2015. Discovery of an essential nucleotidylating activity associated with a newly delineated conserved domain in the RNA polymerase-containing protein of all nidoviruses. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8416-8434.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.**, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Loera-Arias, M.J., Martinez-Perez, A.G., Barrera-Hernandez, A., Ibarra-Obregon, E.R., Gonzalez-Saldivar, G., Martinez-Ortega, J.I., Rosas-Taraco, A., Villanueva-Olivo, A., Esparza-**

Gonzalez, S.C., Villatoro-Hernandez, J., Saucedo-Cardenas, O., Montes-de-Oca-Luna, R., 2010. Targeting and retention of HPV16 E7 to the endoplasmic reticulum enhances immune tumour protection. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 890-894.

Lopez, O.J., Oliveira, M.F., Garcia, E.A., Kwon, B.J., Doster, A., Osorio, F.A., 2007. Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 269-275.

Lopez, O.J., Osorio, F.A., 2004. Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **102**, 155-163.

Loving, C.L., Osorio, F.A., Murtaugh, M.P., Zuckermann, F.A., 2015. Innate and adaptive immunity against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **167**, 1-14.

Lu, X., Pan, J., Tao, J., Guo, D., 2011. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes* **42**, 37-45.

Lugari, A., Betzi, S., Decroly, E., Bonnaud, E., Hermant, A., Guillemot, J.C., Debarnot, C., Borg, J.P., Bouvet, M., Canard, B., Morelli, X., Lecine, P., 2010. Molecular mapping of the RNA cap 2'-O-methyltransferase activation interface between severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp10 and nsp16. *J. Biol. Chem.* **285**, 33230-33241.

Lunney, J.K., Benfield, D.A., Rowland, R.R., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res.* **154**, 1-6.

Luytjes, W., 1995. Coronavirus gene expression: genome organization and protein synthesis, *en*: Siddell, S.G. (Ed.), The Coronaviridae. Plenum Press, New York, pp. 33-54.

Lyoo, Y.S., 2015. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine does not fit in classical vaccinology. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **4**, 159-165.

M

Ma, Y., Wu, L., Shaw, N., Gao, Y., Wang, J., Sun, Y., Lou, Z., Yan, L., Zhang, R., Rao, Z., 2015. Structural basis and functional analysis of the SARS coronavirus nsp14-nsp10 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 9436-9441.

- Maeda, J., Repass, J.F., Maeda, A., Makino, S.,** 2001. Membrane topology of coronavirus E protein. *Virology* **281**, 163-169.
- Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr., Silverman, R.H.,** 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816-819.
- Masters, P.S.,** 1999. Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv. Virus Res.* **53**, 245-264.
- Masters, P.S.,** 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**, 193-292.
- Mateos-Gomez, P.A., Morales, L., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Sola, I.,** 2013. Long-distance RNA-RNA interactions in the coronavirus genome form high-order structures promoting discontinuous RNA synthesis during transcription. *J. Virol.* **87**, 177-186.
- Mateos-Gomez, P.A., Zuñiga, S., Palacio, L., Enjuanes, L., Sola, I.,** 2011. Gene N proximal and distal RNA motifs regulate coronavirus nucleocapsid mRNA transcription. *J. Virol.* **85**, 8968-8980.
- Mateu, E., Diaz, I.,** 2008. The challenge of PRRS immunology. *Vet. J.* **177**, 345-351.
- Matthes, N., Mesters, J.R., Coutard, B., Canard, B., Snijder, E.J., Moll, R., Hilgenfeld, R.,** 2006. The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Lett.* **580**, 4143-4149.
- McBride, R., van Zyl, M., Fielding, B.C.,** 2014. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* **6**, 2991-3018.
- McClurkin, A.W., Norman, J.O.,** 1966. Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **30**, 190-198.
- Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A.,** 2003. Gradual development of the interferon- γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* **309**, 18-31.
- Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Josset, L., Gralinski, L.E., Scobey, T., Agnihothram, S., Katze, M.G., Baric, R.S.,** 2014. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity. *J. Virol.* **88**, 4251-4264.
- Meulenbergh, J.J.,** 2000. PRRSV, the virus. *Vet. Res.* **31**, 11-21.
- Mi, J., Li, Z.Y., Ni, S., Steinwaerder, D., Lieber, A.,** 2001. Induced apoptosis supports spread of adenovirus vectors in tumors. *Hum. Gene. Ther.* **12**, 1343-1352.
- Miknis, Z.J., Donaldson, E.F., Umland, T.C., Rimmer, R.A., Baric, R.S., Schultz, L.W.,** 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J. Virol.* **83**, 3007-3018.

Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., Ziebuhr, J., 2006. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5108-5113.

Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., Greiser-Wilke, I., 2003. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet. J.* **165**, 11-20.

Mogensen, T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240-273.

Mogler, M.A., Kamrud, K.I., 2015. RNA-based viral vectors. *Expert Rev. Vaccines* **14**, 283-312.

Murtaugh, M.P., Genzow, M., 2011. Immunological solutions for treatment and prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Vaccine* **29**, 8192-8204.

Murtaugh, M.P., Laber, J., Elam, M., Faaberg, K.S., Kapur, V., 1998. Genetic variation in the PRRS virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 787-794.

Murtaugh, M.P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* **15**, 533-547.

N

Nakayama, Y., Plisch, E.H., Sullivan, J., Thomas, C., Czuprynski, C.J., Williams, B.R., Suresh, M., 2010. Role of PKR and Type I IFNs in viral control during primary and secondary infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1000966.

Narayanan, K., Makino, S., 2001. Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA Packaging. *J. Virol.* **75**, 9059-9067.

Neuman, B.W., Chamberlain, P., Bowden, F., Joseph, J., 2014. Atlas of coronavirus replicase structure. *Virus Res.* **194**, 49-66.

Nga, P.T., Parquet Mdel, C., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., Yu, F., Thuy, N.T., Inoue, S., Ito, T., Okamoto, K., Ichinose, A., Snijder, E.J., Morita, K., Gorbalenya, A.E., 2011. Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS Pathog.* **7**, e1002215.

Nguyen, V.P., Hogue, B.G., 1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* **71**, 9278-9284.

Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Botner, A., Storgaard, T., 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* **82**, 1263-1272.

Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Llorente, M., Kremer, L., Shuo, S., Enjuanes, L., 2011. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **415**, 69-82.

Nieto-Torres, J.L., Dediego, M.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004077.

Nieto-Torres, J.L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Castaño-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2015. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* **485**, 330-339.

Nodelijk, G., 2002. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with special reference to clinical aspects and diagnosis. A review. *Vet. Q.* **24**, 95-100.

Nogales, A., Marquez-Jurado, S., Galan, C., Enjuanes, L., Almazan, F., 2012. Transmissible gastroenteritis coronavirus RNA-dependent RNA polymerase and nonstructural proteins 2, 3, and 8 are incorporated into viral particles. *J. Virol.* **86**, 1261-1266.

Noymer, A., 2008. Alpha, Significance Level of Test. en P. Lavrakas (Ed.), *Encyclopedia of survey research methods*. SAGE Publications, Inc., Thousand Oaks, CA, p19.

O

OIE, World Organisation for Animal Health. Transmissible gastroenteritis . 2008. World Organisation for Animal Health, Paris, France.

Oleksiewicz, M.B., Nielsen, J., 1999. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Vet. Microbiol.* **66**, 15-27.

Oostra, M., Hagemeijer, M.C., van Gent, M., Bekker, C.P., te Lintelo, E.G., Rottier, P.J., de Haan, C.A., 2008. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J. Virol.* **82**, 12392-12405.

Oostra, M., te Lintelo, E.G., Deijs, M., Verheije, M.H., Rottier, P.J., de Haan, C.A., 2007. Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J. Virol.* **81**, 12323-12336.

Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L., 2002. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* **76**, 11518-11529.

Ortego, J., Sola, I., Almazan, F., Ceriani, J.E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J., Enjuanes, L., 2003. Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology* **308**, 13-22.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* **76**, 4241-4250.

P

Paar, M., Klein, D., Salmons, B., Gunzburg, W.H., Renner, M., Portsmouth, D., 2009. Influence of vector design and host cell on the mechanism of recombination and emergence of mutant subpopulations of replicating retroviral vectors. *BMC Mol. Biol.* **10**, 8.

Page, C., Goicochea, L., Matthews, K., Zhang, Y., Klover, P., Holtzman, M.J., Hennighausen, L., Frieman, M., 2012. Induction of alternatively activated macrophages enhances pathogenesis during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.* **86**, 13334-13349.

Page, K.W., Britton, P., Boursnell, M.E.G., 1990. Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* **4**, 289-301.

Pasternak, A.O., Spaan, W.J., Snijder, E.J., 2006. Nidovirus transcription: how to make sense? *J. Gen. Virol.* **87**, 1403-1421.

Pensaert, M., Van Reeth, K., 1998. Porcine epidemic diarrhea and porcine respiratory coronavirus. *Proc. Ame. Ass. Swi. Pract.*, 433-436.

Penzes, Z., Gonzalez, J.M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Mendez, A., Sanchez, C.M., Sola, I., Almazan, F., Enjuanes, L., 2001. Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* **23**, 105-118.

Perdiguerro, B., Gomez, C.E., Di Pilato, M., Sorzano, C.O., Delaloye, J., Roger, T., Calandra, T., Pantaleo, G., Esteban, M., 2013. Deletion of the vaccinia virus gene A46R, encoding for an inhibitor of TLR signalling, is an effective approach to enhance the immunogenicity in mice of the HIV/AIDS vaccine candidate NYVAC-C. *PLoS One* **8**, e74831.

Perlman, S., Netland, J., 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439-450.

Petry, D.B., Lunney, J., Boyd, P., Kuhar, D., Blankenship, E., Johnson, R.K., 2007. Differential immunity in pigs with high and low responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Anim. Sci.* **85**, 2075-2092.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605-1612.

Plana-Durán, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortes, E., Vela, C., Casal, J.I., 1997. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 protein in protection. *Virus Genes* **14**, 19-29.

Plana-Durán, J., Vayreda, M., Vilarrasa, M., Bastons, J., Rosell, M., Martínez, R., SanGabriel, M.A., Pujols, A., Badiola, J., Ramos, J.L., Domingo, M., 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microbiol.* **33**, 203-211.

Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbarao, K., Denison, M.R., 2004. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J. Virol.* **78**, 9977-9986.

Q

Qi, X., Lan, S., Wang, W., Schelde, L.M., Dong, H., Wallat, G.D., Ly, H., Liang, Y., Dong, C., 2010. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**, 779-783.

R

Renukaradhya, G.J., Meng, X.J., Calvert, J.G., Roof, M., Lager, K.M., 2015. Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine* **33**, 3065-3072.

Ribes, J.M., Ortego, J., Ceriani, J., Montava, R., Enjuanes, L., Buesa, J., 2011. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)-based vectors with engineered murine tropism express the rotavirus VP7 protein and immunize mice against rotavirus. *Virology* **410**, 107-118.

Rossow, K.D., 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* **35**, 1-20.

Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campganioli, R., Icenogle, J.P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.d., Peret, T.C.T., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D.M.E., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J., 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394-1399.

Rowland, R.R., Morrison, R.B., 2012. Challenges and opportunities for the control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Transbound Emerg. Dis.* **59**, 55-59.

Ruch, T.R., Machamer, C.E., 2012. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* **4**, 363-382.

S

Saif, L., Sestak, K., 2006. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus., *en: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., DJ, T. (Eds.), Diseases of Swine.* Blackwell Publishing, Ames, Ames, IA, pp. 489-516.

Saif, L.J., 1996. Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**, 163-169.

Salanueva, I.J., Carrascosa, J.L., Risco, C., 1999. Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* **73**, 7952-7964.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez, C.M., Gebauer, F., Suñe, C., Mendez, A., Dopazo, J., Enjuanes, L., 1992. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology* **190**, 92-105.

Sanchez, C.M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Planas-Duran, J., Enjuanes, L., 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of

transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**, 7607-7618.

Sanchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñe, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., Enjuanes, L., 1990. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* **174**, 410-417.

Sarma, J.D., Scheen, E., Seo, S.H., Koval, M., Weiss, S.R., 2002. Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system. *J. Neurovirol.* **8**, 381-391.

Sawicki, D.L., Wang, T., Sawicki, S.G., 2001. The RNA structures engaged in replication and transcription of the A59 strain of mouse hepatitis virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 386-396.

Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1990. Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* **64**, 1050-1056.

Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G., 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20-29.

Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M., Pekosz, A., 2007. The ORF7b protein of SARS-CoV is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* **81**, 718-731.

Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**, 6620-6630.

Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513-545.

Schwarz, B., Routledge, E., Siddell, S.G., 1990. Murine coronavirus nonstructural protein Ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *J. Virol.* **64**, 4784-4791.

Schwegmann-Wessels, C., Zimmer, G., Laude, H., Enjuanes, L., Herrler, G., 2002. Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to cell surface sialoglycoproteins. *J. Virol.* **76**, 6037-6043.

Scobey, T., Yount, B.L., Sims, A.C., Donaldson, E.F., Agnihothram, S.S., Menachery, V.D., Graham, R.L., Swanstrom, J., Bove, P.F., Kim, J.D., Grego, S., Randell, S.H., Baric, R.S., 2013. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 16157-16162.

Sevajol, M., Subissi, L., Decroly, E., Canard, B., Imbert, I., 2014. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res.* **194**, 90-99.

- Seybert, A., Posthuma, C.C., van Dinten, L.C., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J.,** 2005. A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J. Virol.* **79**, 696-704.
- Shen, H., Fang, S.G., Chen, B., Chen, G., Tay, F.P., Liu, D.X.,** 2009. Towards construction of viral vectors based on avian coronavirus infectious bronchitis virus for gene delivery and vaccine development. *J. Virol. Methods* **160**, 48-56.
- Shen, S., Lin, P.S., Chao, Y.C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.J.,** 2005. The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 286-292.
- Shi, K., Zhang, Q., Yoo, D.,** 2014. Suppression of type I interferon response by nonstructural protein 1 of PEDV through degradation of CREB-binding protein, International PRRS Symposium Chicago, USA, p. 83.
- Silva-Campa, E., Cordoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., Hernandez, J.,** 2010. European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology* **396**, 264-271.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Resendiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., Hernandez, J.,** 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **387**, 373-379.
- Sirinarumit, T., Kluge, J.P., Paul, P.S.,** 1998. Transmissible gastroenteritis virus induced apoptosis in swine testes cell cultures. *Arch. Virol.* **143**, 2471-2485.
- Siu, K.L., Yeung, M.L., Kok, K.H., Yuen, K.S., Kew, C., Lui, P.Y., Chan, C.P., Tse, H., Woo, P.C., Yuen, K.Y., Jin, D.Y.,** 2014. Middle East respiratory syndrome coronavirus 4a protein is a double-stranded RNA-binding protein that suppresses PACT-induced activation of RIG-I and MDA5 in innate antiviral response. *J. Virol.* **88**, 4866-4876
- Smith, E.C., Blanc, H., Vignuzzi, M., Denison, M.R.,** 2013. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* **9**, e1003565.
- Smith, E.C., Case, J.B., Blanc, H., Isakov, O., Shomron, N., Vignuzzi, M., Denison, M.R.,** 2015. Mutations in coronavirus nonstructural protein 10 decrease virus replication fidelity. *J. Virol.* **89**, 6418-6426.
- Smith, E.C., Denison, M.R.,** 2012. Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 519-524.
- Smith, E.C., Denison, M.R.,** 2013. Coronaviruses as DNA wannabes: a new model for the regulation of RNA virus replication fidelity. *PLoS Pathog.* **9**, e1003760.

- Smith, E.C., Sexton, N.R., Denison, M.R.,** 2014. Thinking outside the triangle: Replication fidelity of the largest RNA viruses. *Ann. Rev. Virol.* **1**, 111-132.
- Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J.M., Gorbalenya, A.E.,** 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**, 991-1004.
- Snijder, E.J., Brinton, M.A., Faaberg, K.S., Godeny, E.K., Gorbalenya, A.E., MacLachlan, N.J., Mengeling, W.L., Plagemann, P.G.W.,** 2005. *Arteriviridae*, en: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California, pp. 965-974.
- Snijder, E.J., Spaan, W.J.M.,** 1995. The coronaviruslike superfamily, en: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum press, New York, pp. 239-252.
- Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J., van der Meulen, J., Koerten, H.K., Mommaas, A.M.,** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* **80**, 5927-5940.
- Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L.,** 2015. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* **2**.
- Sola, I., Alonso, S., Zúñiga, S., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.,** 2003. Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J. Virol.* **77**, 4357-4369.
- Sola, I., Galan, C., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Zúñiga, S., Cruz, J.L., Almazan, F., Enjuanes, L.,** 2011a. The polypyrimidine tract-binding protein affects coronavirus RNA accumulation levels and relocalizes viral RNAs to novel cytoplasmic domains different from replication-transcription sites. *J. Virol.* **85**, 5136-5149.
- Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Almazan, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L.,** 2011b. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* **8**, 237-248.
- Sola, I., Moreno, J.L., Zúñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L.,** 2005. Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* **79**, 2506-2516.
- Sperry, S.M., Kazi, L., Graham, R.L., Baric, R.S., Weiss, S.R., Denison, M.R.,** 2005. Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice. *J. Virol.* **79**, 3391-3400.

- St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., Talbot, P.J., 2006.** Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **80**, 3670-3674.
- Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H.D., Rappuoli, R., 2003.** SARS--beginning to understand a new virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 209-218.
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F., Kochs, G., 2007.** The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* **361**, 304-315.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., 1977.** Characterization of a coronavirus. II. Glycoproteins of the viral envelope: tryptic peptide analysis. *Virology* **77**, 650-660.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J., 1980.** Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**, 449-462.
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., Canard, B., 2014a.** SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Res.* **101**, 122-130.
- Subissi, L., Posthuma, C.C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Gorbalenya, A.E., Decroly, E., Snijder, E.J., Canard, B., Imbert, I., 2014b.** One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E3900-3909.
- Surjit, M., Lal, S.K., 2008.** The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 397-405.
- Surya, W., Li, Y., Verdia-Baguena, C., Aguilera, V.M., Torres, J., 2015.** MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus Res.* **201**, 61-66.
- Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L.L., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J.M., Stuart, D.I., 2004.** The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* **12**, 341-353.

- te Velthuis, A.J., Arnold, J.J., Cameron, C.E., van den Worm, S.H., Snijder, E.J., 2010.** The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.* **38**, 203-214.
- Tekes, G., Spies, D., Bank-Wolf, B., Thiel, V., Thiel, H.J., 2012.** A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis. *J. Virol.* **86**, 6994-6998.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S., 2001.** Infectious RNA transcribed *in vitro* from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 1273-1281.
- Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Wessbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., 2003a.** Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**, 2305-2315.
- Thiel, V., Karl, N., Schelle, B., Disterer, P., Klagge, I., Siddell, S.G., 2003b.** Multigene RNA vector based on coronavirus transcription. *J. Virol.* **77**, 9790-9798.
- Thiel, V., Siddell, S.G., 2005.** Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 199-227.
- Thompson, A.J., Locarnini, S.A., 2007.** Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 435-445.
- Thuenemann, E.C., Lenzi, P., Love, A.J., Taliansky, M., Becares, M., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Zahmanova, G.G., Minkov, I.N., Matic, S., Noris, E., Meyers, A., Hattingh, A., Rybicki, E.P., Kiselev, O.I., Ravin, N.V., Eldarov, M.A., Skryabin, K.G., Lomonossoff, G.P., 2013.** The use of transient expression systems for the rapid production of virus-like particles in plants. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 5564-5573.
- Tong, G.-Z., Zhou, Y.J., Hao, X.F., Tian, Z.J., Tong-Qing An, T.Q., Qiu, H.J., 2007.** Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1434-1436.
- Tong, S., Conrardy, C., Ruone, S., Kuzmin, I.V., Guo, X., Tao, Y., Niezgoda, M., Haynes, L., Agwanda, B., Breiman, R.F., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., 2009.** Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 482-485.
- Tooze, J., Tooze, S., Warren, G., 1984.** Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell. Biol.* **33**, 281-294.
- Tooze, J., Tooze, S.A., Fuller, S.D., 1987.** Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-golgi network of AtT20 cells. *J. Cell Biol.* **105**, 1215-1226.

Totura, A.L., Baric, R.S., 2012. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 264-275.

V

Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, J.Q., Crocker, P.R., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* **6**, e1000730.

van den Worm, S.H., Eriksson, K.K., Zevenhoven, J.C., Weber, F., Züst, R., Kuri, T., Dijkman, R., Chang, G., Siddell, S.G., Snijder, E.J., Thiel, V., Davidson, A.D., 2012. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS One* **7**, e32857.

van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B., 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368-373.

van Hemert, M.J., van den Worm, S.H., Knoop, K., Mommaas, A.M., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., 2008. SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *PLoS Pathog.* **4**, e1000054.

van Rijn, P.A., Bossers, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1996. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J Gen Virol* **77**, 2737-2745.

Vanhee, M., Costers, S., Van Breedam, W., Geldhof, M.F., Van Doorselaere, J., Nauwynck, H.J., 2010. A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains. *Viral. Immunol.* **23**, 403-413.

Vanhee, M., Van Breedam, W., Costers, S., Geldhof, M., Noppe, Y., Nauwynck, H., 2011. Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine* **29**, 4794-4804.

Verdia-Baguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., Dediego, M.L., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L., 2012. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology* **432**, 485-494.

Verheije, M.H., Welting, T.J., Jansen, H.T., Rottier, P.J., Meulenberg, J.J., 2002. Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology* **303**, 364-373.

W

Walker, P.J., Bonami, J.R., Boonsaeng, V., Chang, P.S., Cowley, J.A., Enjuanes, L., Flegel, T.W., Lightner, D.V., Loh, P.C., Snijder, E.J., Tang, K., 2005. *Roniviridae*, en: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California, pp. 975-979.

Wang, K., Boysen, C., Shizuya, H., Simon, M.I., Hood, L., 1997. Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *BioTechniques* **23**, 992-994.

Wang, L., Wu, Y.Z., Chen, A., Zhang, J.B., Yang, Z., Niu, W., Geng, M., Ni, B., Zhou, W., Zou, L.Y., Jiang, M., 2004. MHC class I-associated presentation of exogenous peptides is not only enhanced but also prolonged by linking with a C-terminal Lys-Asp-Glu-Leu endoplasmic reticulum retrieval signal. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3582-3594.

Wang, R., Zhang, Y.J., 2014. Antagonizing interferon-mediated immune response by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 315470.

Wang, Z.D., Ueda, S., Uyeda, I., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Tacahashi, Y., Sato, M., Ohya, K., Sugimoto, C., Matsumura, T., 2003. Positional effect of gene insertion on genetic stability of a clover yellow vein virus-based expression vector. *J. Gen. Plant. Pathol.* **69**, 327-334.

Wathelet, M.G., Orr, M., Frieman, M.B., Baric, R.S., 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J. Virol.* **81**, 11620-11633.

Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., Paludan, S.R., 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J. Virol.* **80**, 5059-5064.

Welch, S.K., Calvert, J.G., 2010. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res.* **154**, 98-103.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., et al., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* **13**, 121-130.

Wesley, R.D., Woods, R.D., Cheung, A.K., 1991. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **65**, 3369-3373.

Williams, B.R., 2001. Signal integration via PKR. *Sci STKE* **2001**, re2.

Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y., 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**, 884-895.

Woods, R.D., Wesley, R.D., 1998. Transmissible gastroenteritis coronavirus carrier sow. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 641-648.

X

Xu, L., Khadijah, S., Fang, S., Wang, L., Tay, F.P., Liu, D.X., 2010. The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication. *J. Virol.* **84**, 8571-8583.

Xu, X., Liu, Y., Weiss, S., Arnold, E., Sarafianos, S.G., Ding, J., 2003. Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res.* **31**, 7117-7130.

Y

Ye, Y., Hauns, K., Langland, J.O., Jacobs, B.L., Hogue, B.G., 2007. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* **81**, 2554-2563.

Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T., Platt, K.B., 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**, 305-312.

Youn, S., Collisson, E.W., Machamer, C.E., 2005. Contribution of trafficking signals in the cytoplasmic tail of the infectious bronchitis virus spike protein to virus infection. *J. Virol.* **79**, 13209-13217.

Yount, B., Curtis, K.M., Baric, R.S., 2000. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: the transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.* **74**, 10600-10611.

Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W., Baric, R.S., 2003. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12995-13000.

Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R., Baric, R.S., 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **76**, 11065-11078.

Yount, B., Roberts, R.S., Sims, A.C., Deming, D., Frieman, M.B., Sparks, J., Denison, M.R., Davis, N., Baric, R.S., 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J. Virol.* **79**, 14909-14922.

Z

Zalinger, Z.B., Elliott, R., Rose, K.M., Weiss, S.R., 2015. MDA5 is critical to host defense during infection with murine coronavirus. *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.01470-15

Zeier, Z., Aguilar, J.S., Lopez, C.M., Devi-Rao, G.B., Watson, Z.L., Baker, H.V., Wagner, E.K., Bloom, D.C., 2009. A limited innate immune response is induced by a replication-defective herpes simplex virus vector following delivery to the murine central nervous system. *J. Neurovirol.* **15**, 411-424.

Zhai, Y., Sun, F., Li, X., Pang, H., Xu, X., Bartlam, M., Rao, Z., 2005. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 980-986.

Zhang, Z., Kim, T., Bao, M., Facchinetti, V., Jung, S.Y., Ghaffari, A.A., Qin, J., Cheng, G., Liu, Y.J., 2011. DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity* **34**, 866-878.

Zhao, L., Jha, B.K., Wu, A., Elliott, R., Ziebuhr, J., Gorbalenya, A.E., Silverman, R.H., Weiss, S.R., 2012. Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe* **11**, 607-616.

Zhou, S., Cerny, A.M., Zacharia, A., Fitzgerald, K.A., Kurt-Jones, E.A., Finberg, R.W., 2010. Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **84**, 9452-9462.

Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K.A., Shi, P.Y., Li, H., 2007. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J. Virol.* **81**, 3891-3903.

- Ziebuhr, J.**, 2005. The coronavirus replicase, *en*: Enjuanes, L. (Ed.), Coronavirus replication and reverse genetics. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 57-94.
- Zimmerman, J.**, 2003. Historical Overview of PRRS Virus, *en*: Zimmerman, J., Yoon, K.J., Neuman, E. (Eds.), 2003 PRRS Compendium Producer Edition. National Pork Board.
- Zinzula, L., Tramontano, E.**, 2013. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: hide, mask, hit. *Antiviral Res.* **100**, 615-635.
- Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F.**, 2007. Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* **123**, 69-85.
- Zuñiga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L.**, 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* **84**, 2169-2175.
- Zuñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L.**, 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **78**, 980-994.
- Zuñiga, S., Sola, I., Cruz, J.L., Enjuanes, L.**, 2009. Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus Res.* **139**, 253-266.
- Zuñiga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 2007. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**, 215-227.
- Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., Siddell, S.G., Ludewig, B., Thiel, V.**, 2011. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**, 137-143.

